

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年2月22日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/12814 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/31, 15/52,  
15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68

Yuki) [JP/JP]. 細瀬雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko)  
[JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒  
971-8183 福島県いわき市泉町下川字大廻389-4 三共  
株式会社内 Fukushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420

(22) 国際出願日: 2000年8月11日 (11.08.2000)

(74) 代理人: 大野彰夫, 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710  
東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo  
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN,  
KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.

(30) 優先権データ:  
特願平11/227696 1999年8月11日 (11.08.1999) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株  
式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒  
103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo  
(JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

(54) 発明の名称: ML-236B 生合成関連DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereinto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーよりクローニ  
ングされた、該菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善す  
ることを特徴とするDNA等を提供する。

本発明の提供するDNAは、ML-236B生産菌内に導入されることにより、  
該菌のML-236B生産能を改善する。

WO 01/12814 A1



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日 *Published*  
2001 年 2 月 22 日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/12814 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/31, 15/52, 15/63, 1/19, 1/21, C12P 7/40, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05420 *filed*
- (22) 国際出願日: 2000 年 8 月 11 日 (11.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平 11/227696 1999 年 8 月 11 日 (11.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三共株式会社 (SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部有生 (ABE,
- Yuki) [JP/JP]. 細瀬雅彦 (HOSOBUCHI, Masahiko) [JP/JP]. 吉川博治 (YOSHIKAWA, Hiroji) [JP/JP]; 〒971-8183 福島県いわき市泉町下川字大鷲 389-4 三共株式会社内 Fukushima (JP).
- (74) 代理人: 大野彰夫. 外(OHNO, Akio et al.); 〒140-8710 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 58 号 三共株式会社内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ML-236B BIOSYNTHESIS-ASSOCIATED DNA

(54) 発明の名称: ML-236B 生合成関連 DNA

(57) Abstract: A DNA which has been cloned from a genomic DNA library of an ML-236B producing microorganism and is characterized by being capable of improving the ML-236B productivity of this strain when transferred thereto, etc. When transferred into the ML-236B producing strain, the above DNA improves the ML-236B productivity of this strain.

(57) 要約:

本発明は、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングされた、該菌内に導入されることにより該菌の ML-236B 生産能を改善することを特徴とする DNA 等を提供する。

本発明の提供する DNA は、ML-236B 生産菌内に導入されることにより、該菌の ML-236B 生産能を改善する。

WO 01/12814 A1

ID AAF74546 standard; DNA; 34203 BP.  
 XX  
 AC AAF74546;  
 XX  
 DT 14-MAY-2001 (first entry)  
 XX  
 DE Penicillium citrinum ML-236B biosynthesis-associated DNA SEQ ID NO:1.  
 XX  
 KW Penicillium citrinum; ML-236B biosynthesis; antilipaemic; hyperlipaemia;  
 KW HMG-CoA reductase inhibitor; ds.  
 XX  
 OS Penicillium citrinum.  
 XX  
 PN WO200112814-A1.  
 XX  
 PD 22-FEB-2001.  
 XX  
 PF 11-AUG-2000; 2000WO-JP05420.  
 XX  
 PR 11-AUG-1999; 99JP-0227696.  
 XX  
 PA (SANY ) SANKYO CO LTD.  
 XX  
 PI Abe Y, Hosobuchi M, Yoshikawa H;  
 XX  
 DR WPI; 2001-202868/20.  
 XX  
 PT New DNA for transfer into a microbial strain to enhance productivity of  
 PT the HMG-CoA reductase inhibitor designated ML-236B, for treating  
 PT hyperlipemia -  
 XX  
 PS Claim 1; Page 69-89; 128pp; Japanese.  
 XX  
 CC The present invention describes a DNA sequence (I) containing a sequence  
 CC (S1) of 34203 base pairs (bp) (the present sequence) which can be  
 CC transferred into an ML-236B producing strain to improve productivity,  
 CC obtained from transformant Escherichia coli pML48 SANK71199 strain  
 CC (FERM BP-6780). The modified microorganism is capable of improving its  
 CC ML-236B productivity for use as HMG-CoA reductase inhibitor in treating  
 CC hyperlipaemia, and can also be used in clarifying the directions and  
 CC locations of the 6 structural genes in the DNA. (I) has antilipaemic  
 CC activity, and can be used as an HMG-CoA reductase inhibitor.  
 XX  
 SQ Sequence 34203 BP; 8506 A; 8634 C; 8543 G; 8520 T; 0 other;

Query Match 88.6%; Score 1222; DB 22; Length 34203;  
 Best Local Similarity 90.9%; Pred. No. 0;  
 Matches 1380; Conservative 0; Mismatches 0; Indels 138; Gaps 2;

Qy 1 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTGCGCGGTTTCGACGCTCA 60  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33804 ATGTCCCTGCCGCATGCAACGATTCCGACGAACCTACGCCGTGCGCGGTTTCGACGCTCA 33745  
 Qy 61 TGTGACCGGTGTCATGCACAAAAGCTCAAATGTACCGGTAGCAATGCCAATTTAGTCCGT 120  
 : ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33744 TGTGACCGGTGTCATGCACAAAAGCTCAAATGTACCGGTAGCAATGCCAATTTAGTCCGT 33685

41  
seq

also in the EP document

appl.

= seq 11  
 NO: 11  
 in the  
 application  
 @1007.

in IDS #8

Qy 121 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 180  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33684 GCTCAGTGTCAACGTTGTCAACAAGCCGGATTAAGGTGTGTGTACAGCGAAAGGCTACCC 33625

Qy 181 AAGCGCAATTTACATAAAGAAGCCGCAGCTGGAACACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 240  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33624 AAGCGCAATTTACATAAAGAAGCCGCAGCTGGAACACAAGAGCCACAGAAACCTCACAA 33565

Qy 241 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 300  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33564 CCGATGACCGCGACATCTTCTACGGTCTTCTCATCATTGGCAGAGACTCCTCCACCTTAC 33505

Qy 301 TGCTCACCACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACCTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 360  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33504 TGCTCACCACCTACGCATATTGGCACCTCGGCACCTCAAGGAAACATTATCAGAACCATCA 33445

Qy 361 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTTGATGATCCCGAGTCGTTTCCC 420  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33444 GCGGCAACCCTGCAATTCTATGATACATCAATCAACTTTGATGATCCCGAGTCGTTTCCC 33385

Qy 421 GGCGGCTGGCCTCAGCCAAATACATTTGCGGACGATGCCAACAGCAATGAATCTTCGGGG 480  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33384 GGCGGCTGGCCTCAGCCAAATACATTTGCGGACGATGCCAACAGCAATGAATCTTCGGGG 33325

Qy 481 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTTGAAGGCCCTTTGGATGCAACGGCGCCTGTCTCGCCA 540  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33324 ATACCAGATCTAGGCTACGACTTTGAAGGCCCTTTGGATGCAACGGCGCCTGTCTCGCCA 33265

Qy 541 TCGCTGTTTGACCTCGAAGTAGAGGGGAACTCGTCATCCGGACAATCCAACACAAGCAAC 600  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33264 TCGCTGTTTGACCTCGAAGTAGAGGGGAACTCGTCATCCGGACAATCCAACACAAGCAAC 33205

Qy 601 ACGCAACGAGACCTTTTCGAAAGTCTGTCCGGATGTGTACAGGACCTAGAGGTAATACTC 660  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33204 ACGCAACGAGACCTTTTCGAAAGTCTGTCCGGATGTGTACAGGACCTAGAGGTAATACTC 33145

Qy 661 CACGGGGTGACTGTGGAATGGCCCAAGCAAAAAATTTTAAGCT----- 703  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33144 CACGGGGTGACTGTGGAATGGCCCAAGCAAAAAATTTTAAGCTGTGAGATTTTCAATTCT 33085

Qy 704 -----ACCCGATAGGGGACTTT 720  
 ||||||||||||||||||  
 Db 33084 GCCTGTTTACTGCCTCTTGATTGTCGCTAAAGCTTCTTCCTAGACCCGATAGGGGACTTT 33025

Qy 721 TTGAATGCCTTTGGTAGATTGCTACTACATCTTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 780  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 33024 TTGAATGCCTTTGGTAGATTGCTACTACATCTTCAAGAACGTGTGATCACGAGCAGCAAT 32965

Qy 781 AGCAGCATGTTAGATGGGTGTCTGCAAACCAAGAACTTGTTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 840  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 32964 AGCAGCATGTTAGATGGGTGTCTGCAAACCAAGAACTTGTTTCATGGCGGTGCATTGCTAC 32905

Qy 841 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 900  
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  
 Db 32904 ATGTTGTCTGTCAAAATCATGACATCACTTTCCCAGCTGCTACTATCCGAGGTGATGAAA 32845

Qy 901 GCCCAACCTTGTGGACAAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTCAACC 960  
 |||  
 Db 32844 GCCCAACCTTGTGGACAAAAGCAAAGCACACGAATGGATTGGTACTGGTCTGGCTCAACC 32785

Qy 961 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCACTTCCCTCGTTTCACTCTAATCTTCATATC 1020  
 |||  
 Db 32784 ACTAGAAATGACAATGGAAGAGCCGAAGCACTTCCCTCGTTTCACTCTAATCTTCATATC 32725

Qy 1021 GGCGAGCTCATTTACATCTCGACCCATTTCATGCACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 1080  
 |||  
 Db 32724 GGCGAGCTCATTTACATCTCGACCCATTTCATGCACGCCTTATCTTCTGCATGCACGACA 32665

Qy 1081 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTTGGGGATAGCACAGGAG 1140  
 |||  
 Db 32664 TTGCGTGTAAGCCTTCGACTATTGAGTGAGATTGAGACTGCTTTGGGGATAGCACAGGAG 32605

Qy 1141 CACGGGGCTGCGGCATCTATTTCGTCTA----- 1167  
 |||  
 Db 32604 CACGGGGCTGCGGCATCTATTTCGTCTAGTAAGTGGGACCGATAACCACCAGTCTTTTCTT 32545

Qy 1168 -----GTCCTATCAGATATG 1182  
 |||  
 Db 32544 CCCTTGATACATCAGCAATGCGCTGACCGGGAGAGGGGAATAGGTCCTATCAGATATG 32485

Qy 1183 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACCATAACGCCGGCCTCTCGT 1242  
 |||  
 Db 32484 CCAAGCACATCGTGGCAAATCCTTGGCGCTGAAAATAAAACCATAACGCCGGCCTCTCGT 32425

Qy 1243 CTCCTATCTGTGCTTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCCAAGTCAACAAAGGCC 1302  
 |||  
 Db 32424 CTCCTATCTGTGCTTTGGAGTGACGAAGCCGGAGACGAAGAGCCCAAGTCAACAAAGGCC 32365

Qy 1303 TCAGGGAAGACGATAAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTCGCATTAGCGAAG 1362  
 |||  
 Db 32364 TCAGGGAAGACGATAAATGTGTTGCGACGTTGCTATAAGGAAATATTCGCATTAGCGAAG 32305

Qy 1363 AAACACAATATTGCTTAG 1380  
 |||  
 Db 32304 AAACACAATATTGCTTAG 32287

## 明細書

## ML-236B 生合成関連DNA

## 「技術分野」

本発明は、HMG-CoA還元酵素阻害剤ML-236B生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、該DNAとハイブリダイズする核酸分子、該DNAを組み込んだ組換えDNAベクター、該組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、ML-236Bの製造法、該DNA上の塩基配列に基づいて設計されたPCR用プライマー等に関する。

## 「背景技術」

高脂血症改善薬として臨床において使用されているHMG-CoA還元酵素阻害剤プラバスタチンは、ペニシリウム・シトリナムが生産するML-236Bをストレプトミセス・カルボフィラス (*Streptomyces carbophilus*) により微生物変換することにより得られる (Endo, A., et al., J. Antibiot., 29, 1346 (1976) ; Matsuoka, S., et al., Eur. J. Biochem., 184, 707 (1989) 記載)。

プラバスタチンの前駆体ML-236B、及び、プラバスタチンと部分構造を共有するHMG-CoA阻害剤ロバスタチンは、ともにポリケチドを経て生合成されることが示されている (Moore, R. N., et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 3694 (1985) ; Shiao, M. and Don, H. S., Proc. Natl. Sci. Counc. ROC., 11, 223 (1987) 記載)。

ポリケチドとは、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの低分子カルボン酸残基の連続的な縮合反応から生じる $\beta$ -ケト炭素鎖から導かれる化合物の総称であり、各 $\beta$ -ケトカルボニル基の縮合・還元様式により、多様な構造が導かれる (Hopwood, D. A. and Sherman, D. H., Annu. Rev. Genet., 24, 37-66 (1990) ; Hutchinson, C. R. and Fujii, I., Annu. Rev. Genet., 49, 201-238 (1995) 記載)。

ポリケチドの合成を担うポリケチド・シンターゼ (Polyketide Synthase : 以下、「PKS」という。) は糸状菌や細菌の有する酵素であることが知られており、糸状菌では該酵素の分子生物学的研究がなされている

(Feng, G. H. and Leonard, T. J., J. Bacteriol., 177, 6246 (1995) : Takano, Y., et al. Mol. Gen. Genet. 249, 162 (1995) 記載)。ロバスタチン生産菌であるアスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) については、トリオール P K S 遺伝子の解析がなされている (特表平 9-504436 号公報記載)。

ところで、糸状菌の二次代謝産物の生合成関連遺伝子は、ゲノム上でクラスターを形成していることが少なくない。ポリケチドの生合成系にて、該系に関与する遺伝子クラスターの存在が知られている。アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) の生産するポリケチドであるアフラトキシンの生合成では、P K S その他ポリケチドの生合成に関与する酵素蛋白質をコードする遺伝子がクラスター構造を形成していることが知られており、両菌のアフラトキシシン生合成関連遺伝子のゲノム比較解析が行なわれている (Yu, J., et al, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2365 (1995) 記載)。アスペルギルス・ニジュランズ (*Aspergillus nidulans*) の生産するステリグマトシスチンの生合成においては、生合成関連遺伝子が、ゲノム上の連続する約 60 kb の領域においてクラスター構造を形成していることが報告されている (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載)。

ML-236B 生合成に関する分子生物学的研究は、現在まで十分にはなされていないかった。

#### 「発明の開示」

発明者らは、ペニシリウム・シトリナムの ML-236B 生合成を担う酵素の遺伝子又は遺伝子クラスターを、ML-236B 生産菌のゲノム DNA ライブラリーよりクローニングし、得られた組換え DNA ベクターを用いて該生産菌を形質転換することにより、該生産菌において ML-236B の生産性が改善されることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、

(1) 配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 乃至 34203 で示される塩基



配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(2) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、(1) 記載のDNA、

(3) (1) 又は (2) 記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(4) (1) 又は (2) 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA、

(5) (1) 乃至 (4) のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター、

(6) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、(5) 記載の組換えDNAベクター、

(7) (5) 又は (6) 記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞、

(8) ML-236B生産菌であることを特徴とする (7) 記載の宿主細胞、

(9) ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、(8) 記載の宿主細胞、

(10) (8) 又は (9) 記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法、

(11) 大腸菌であることを特徴とする、(7) 記載の宿主細胞、

(12) 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、(11) 記載の宿主細胞、

(13) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1、

(14) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA2

(但し、該PCR用プライマーA2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(15) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA3

(但し、該PCR用プライマーA3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(16) (13) 記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA4

(但し、該PCR用プライマーA4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(17) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号1479のシトシン又はそれより5' -側の塩基を5' -末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーB1、

(18) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と70%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB2

(但し、該PCR用プライマーB2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(19) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と80%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB3

(但し、該PCR用プライマーB3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(20) (17) 記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と90%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB4

(但し、該PCR用プライマーB4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(21) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号11748のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーC1、

(22) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC2

(但し、該PCR用プライマーC2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(23) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC3

(但し、該PCR用プライマーC3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

(24) (21) 記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)

(25) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1、

(26) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD2

(但し、該PCR用プライマーD2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(27) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD3

(但し、該PCR用プライマーD3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(28) (25) 記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD4

(但し、該PCR用プライマーD4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(29) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号11796のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーE1、

(30) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE2

(但し、該PCR用プライマーE2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(31) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE3

(但し、該PCR用プライマーE3が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(32) (29) 記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と90%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE4

(但し、該PCR用プライマーE4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号11796乃至11798によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(33) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号20723のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーF1、

(34) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF2

(但し、該PCR用プライマーF2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(35) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF3

(但し、該PCR用プライマーF3が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(36) (33)記載のPCR用プライマーF1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーF4

(但し、該PCR用プライマーF4が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号13476乃至13478によりコードされるシステイン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(37) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号24321のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーG1、

(38) (37)記載のPCR用プライマーG1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーG2

(但し、該PCR用プライマーG2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番

号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

( 3 9 ) ( 3 7 ) 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 3

( 但し、該 PCR 用プライマー G 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

( 4 0 ) ( 3 7 ) 記載の PCR 用プライマー G 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G 4

( 但し、該 PCR 用プライマー G 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 4 3 2 1 乃至 2 4 3 2 3 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

( 4 1 ) 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 6 3 1 2 のチミン又はそれより 5 ' 一側の塩基を 5 ' 一末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 1 、

( 4 2 ) ( 4 1 ) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 2

( 但し、該 PCR 用プライマー H 2 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

( 4 3 ) ( 4 1 ) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 3

( 但し、該 PCR 用プライマー H 3 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 2 7 8 8 7 乃至 2 7 8 8 9 でコードされるアルギニン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る) 、

( 4 4 ) ( 4 1 ) 記載の PCR 用プライマー H 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー H 4

( 但し、該 PCR 用プライマー H 4 は、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番

号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(45) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号3545のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI1、

(46) (45) 記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI2

(但し、該PCR用プライマーI2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(47) (45) 記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI3

(但し、該PCR用プライマーI3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(48) (45) 記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI4

(但し、該PCR用プライマーI4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(49) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号28472のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ1、

(50) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ2

(但し、該PCR用プライマーJ2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(51) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ3

(但し、該PCR用プライマーJ3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(52) (49) 記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ4

(但し、該PCR用プライマーJ4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(53) 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号400のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK1、

(54) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK2

(但し、該PCR用プライマーK2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(55) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK3

(但し、該PCR用プライマーK3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(56) (53) 記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK4

(但し、該PCR用プライマーK4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、



(57) 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号32287のシトシン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL1、

(58) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL2

(但し、該PCR用プライマーL2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、

(59) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL3

(但し、該PCR用プライマーL3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、及び、

(60) (57) 記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL4

(但し、該PCR用プライマーL4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)、  
に関する。

本発明は、ML-236B生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善することを特徴とする、該生産菌のゲノムに由来するDNA(以下、「ML-236B生合成関連DNA」という。)等に関する。

本発明において、ML-236B生産菌とは、ML-236B生産能を先天的に有する微生物をいう。ML-236B生産菌としては、例えば、ペニシリウム(Penicillium)属に属するML-236B生産菌が挙げられ、ペニシリウム・シトリナム、ペニシリウム・ブレビコンパクトム(Penicilium brevicompactum: Brown, A. G., et al., J. Chem. Soc. Perkin-1., 1165(1976)記載)、ペニシリウム・シクロピウム(Penicillium cyclopium: Doss, S. L., et al., J. Natl. Prod.,

49,357(1986)記載)等が例示される。さらに、これら以外に、ユーペニシリウム・エスピー M6603 (Eupenicillium sp. M6603: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ペシロミセス・ビリディス FERM P-6236 (Paecilomyces viridis FERM P-6236: 特開昭58-98092号公報記載)、ペシロミセス・エスピー M2016 (Paecilomyces sp. M2016: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、トリコデルマ・ロンギブラチアタム M6735 (Trichoderma longibrachiatum M6735: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、ヒポミセス・クリソスペルムス IFO 7798 (Hypomyces chrysospermus IFO 7798: Endo, A., et al., J. Antibiot. -Tokyo, 39, 1609(1986)記載)、グリオクラディウム・エスピー YJ-9515 (Gliocladium sp. YJ-9515: WO 9806867号公報記載)、トリコデルマ・ビリデ IFO 5836 (Trichoderma viride IFO 5836: 特公昭62-1915号公報記載)、ユーペニシリウム・レチクリスポルム IFO 9022 (Eupenicillium reticulisporum IFO 9022: 特公昭62-19159号公報記載)等が挙げられる。これらのML-236B生産菌のうち、好適にはペニシリウム・シトリナムであり、より好適にはペニシリウム・シトリナム SANK13380株である。ペニシリウム・シトリナム SANK13380株は、平成4年(1992年)12月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-4129を付された。

ML-236B生合成関連DNAは、ML-236B生産菌のゲノムDNAライブラリーに対して、類似の機能を有するものと推測される糸状菌由来のDNAの塩基配列に基いて設計されるプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより得られる。

ゲノムDNAライブラリーの作成法としては、通常真核生物のゲノムDNAライブラリーを作製するための方法であれば特に限定されないが、例えば、マニァティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)記

載)等が挙げられる。

ML-236B生産菌のゲノムDNAは、該生産菌培養物から菌体を回収して物理的に破碎した後、核内DNAを抽出、精製することにより得られる。

ML-236B生産菌の培養は、各ML-236B生産菌に適した条件下で行なうことができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌体を培養したスラントから、MBG3-8培地（組成；7% (w/v) グリセリン、3% (w/v) グルコース、1% (w/v) 大豆粉、1% (w/v) ペプトン（極東製薬工業（株）製）、1% (w/v) コーンステープリカー（ホーネンコーポレーション（株）製）、0.5% (w/v) 硝酸ナトリウム、0.1% (w/v) 硫酸マグネシウム七水和物、pH 6.5）へ該菌体を接種し、22乃至28℃、3乃至7日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。該スラントは、溶解させたPGA寒天培地（組成；200 g/L 馬鈴薯抽出液、15% (w/v) グリセリン、2% (w/v) 寒天）を試験管に注ぎ、傾斜させつつ固化させたものに、白金耳を用いてペニシリウム・シトリナムを接種し、22乃至28℃、7乃至15日保温することにより作製する。該スラントを0乃至4℃で保存することにより、該スラント上で該菌を継続的に生存させることができる。

液体培地で培養したML-236B生産菌の菌体は、遠心分離により、固体培地で培養した該菌の菌体は、セル・スクレーパー等でかきとることにより、それぞれ回収することができる。

菌体の物理的破碎は、菌体を液体窒素等で凍結しつつ乳鉢と乳棒ですり潰すことにより行なうことができる。破碎された菌体の核内DNAの抽出は、ドデシル硫酸ナトリウム（sodium dodecyl sulphate：以下、「SDS」という。）等の界面活性剤を用いて行なうことができる。抽出されたゲノムDNAは、フェノール・クロロホルム抽出を行なうことにより除タンパクされ、エタノール沈澱を行なうことにより沈澱として回収することができる。

得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で限定分解させ、断片化する。限定分解に使用される制限酵素としては、通常入手可能な制限酵素であれば特に限定されないが、例えば、Sau3A I等を挙げることができる。断片化されたDNA

をゲル電気泳動に供し、適当なサイズのゲノムDNAを含むゲルからDNAを回収する。DNA断片のサイズには特に限定はないが、好適には20 kb以上である。

ゲノムDNAライブラリー作製のDNAベクターとしては、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞内で複製されるのに必要な塩基配列を有するものであれば特に限定されないが、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクター、BACベクター等が挙げられ、好適にはコスミドベクターである。また、これらDNAベクターは発現ベクターであってもよい。さらに、該DNAベクターは、該DNAベクターで形質転換された宿主細胞に表現形質（表現型；Phenotype）の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該DNAベクターは、クローニング及び機能発現の双方に適用できるものであることが好ましい。該DNAベクターとしては、複数の微生物群に形質転換可能なシャトルベクターを用いることが好ましい。該シャトルベクターは、少なくとも一方の微生物群の宿主細胞において複製されるのに必要な塩基配列を有する。また、シャトルベクターは複数の微生物群の宿主にそれぞれ表現形質の選択性を付与する塩基配列を有していることが好ましい。

該シャトルベクターにより形質転換される微生物群の組合わせとしては、一方の微生物群がクローニングに適用でき且つ他方がML-236B生産能を有していれば特に限定されないが、例えば、細菌及び糸状菌の組合わせ、酵母及び糸状菌の組合わせ等が挙げられ、好適には細菌及び糸状菌の組合わせである。細菌としては、通常遺伝子工学に使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、大腸菌、枯草菌等を挙げることができ、好適には大腸菌であり、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株である。酵母としては、通常遺伝子工学に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）等を挙げるができる。糸状菌としては、上述のML-236B生産菌等が挙げられる。なお、本発明において微生物群は、細菌、糸状菌及び酵母から選択される。

このようなシャトルベクターとしては、例えば、適当な表現型選択マーカー遺伝子及びコス（cos）部位を有するコスミドベクター等を挙げることができ、好適には大腸菌ハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子配列を有するプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）にコスミドベクターpWE15（STRATAGENE社製）の有するコス（cos）部位を挿入して作製されたpSAKcos1が挙げられるが、これらに限定されない。pSAKcos1の構築手順については図1に記載されている。

上述のML-236B生産菌ゲノムDNA断片をライゲーションしたシャトルベクターを宿主細胞に導入することにより、所望のゲノムDNAライブラリーが完成する。宿主細胞には、好適には大腸菌、より好適には大腸菌XL1-BlueMR株がそれぞれ使用される。宿主細胞が大腸菌の場合、該導入はin vitroパッケージングにより行なう。本発明において、形質転換とは、in vitroパッケージングによる外来DNAの導入も意味し、in vitroパッケージングにより外来DNAを導入された細胞も形質転換細胞の意味に包含される。

所望のクローンのスクリーニングには、抗体又は核酸プローブを用い、好適には、核酸プローブを用いる。該核酸プローブは、糸状菌のポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて作製することができる。このような遺伝子としては、ポリケチドの生合成への関与が確認され且つ塩基配列が公知のものであれば特に限定されないが、例えば、アスペルギルス・フラヴァス（*Aspergillus flavus*）及びアスペルギルス・パラシティカス（*Aspergillus parasiticus*）のアフラトキシンPKS遺伝子、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）のストリグマトシスチンPKS遺伝子等を挙げることができる。

該核酸プローブは、上述の公知の塩基配列に基づいて、ゲノムDNAの部分塩基配列からなるオリゴヌクレオチドプローブの合成により、またオリゴヌクレオチドプライマーを作製し、ゲノムDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction：以下、「PCR」という。：Saiki, R. K., et al., Science, 239, 487 (1988) 記載）を行なうことにより、

又は、mRNAを鋳型として、逆転写酵素 (reverse transcriptase) でcDNAを合成した後、PCRを行なう方法 (逆転写PCR: reverse transcription-PCR: 以下、「RT-PCR」という。) 等により、取得することができる。

核酸プローブのML-236B生産菌からのPCR又はRT-PCRによる取得方法は、以下の通りである。PCR又はRT-PCRに使用するプライマー (以下、「PCR用プライマー」という。) の設計は、塩基配列が公知であるところのポリケチド生合成関連遺伝子の塩基配列に基づいて、好適にはアスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*)、アスペルギルス・パラシティカス (*Aspergillus parasiticus*) のアフラトキシンPKS遺伝子又はアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) のストリグマトシスチンPKS遺伝子の塩基配列に基づいて設計することができる。これらのうちいずれか一つのPKSのアミノ酸配列上で種間保存性の高いアミノ酸配列を塩基配列に還元することにより、PCR用プライマーを設計することができる。アミノ酸配列から塩基配列に還元する方法としては、宿主のコドン使用頻度を考慮して単一の配列を導く方法又は多重コドンを使用して混合配列 (以下、「ミックス・プライマー」という。) を導く方法の二通りが使用できる。後者の場合、塩基配列にヒポキサンチンを含むさせることにより多重度を下げることができる。

また、PCR用プライマーには、鋳型鎖とアニーリングするための塩基配列に加え、該プライマーの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

さらに、PCR用プライマーの設計においては、グアニン塩基の数とシトシン塩基の数の和が総塩基数の40乃至60%であることが好ましい。また、自己アニーリングし難いことが好ましい。一組のPCR用プライマーにおいては、双方のPCR用プライマー同士がアニーリングし難いことが好ましい。

また、PCR用プライマーの塩基数は、PCRに適用できれば特に限定されないが、その範囲の下限は10乃至14、上限は40乃至60であり、好適な範囲は14乃至40である。

さらに、PCR用プライマーは、好適にはDNAである。該プライマーを構成するヌクレオシドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、アデノシン、シチジン、ウリジン及びグアノシンに加え、デオキシイノシン、イノシン等が挙げられる。

また、PCR用プライマーの5'-末端に位置するヌクレオシドの5'-位は、水酸基であるか、又は、該水酸基に一リン酸がエステル結合した状態である。

さらに、PCR用プライマーの合成は、通常核酸の合成に使用される方法、例えば、ホスフォロアミダイト法により行なうことができ、このような方法には、DNA自動合成機が好適に使用される。

PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のゲノムDNAが、RT-PCRの鋳型としては、ML-236B生産菌のmRNAが、それぞれ使用できる。なお、RT-PCRの鋳型としては、mRNAの代わりに全RNAを使用することも可能である。

PCR産物又はRT-PCR産物をこのものに適したDNAベクターに組込むことにより、該PCR産物又はRT-PCR産物をクローニングすることができる。該クローニングに用いるDNAベクターとしては、通常DNA断片をクローニングするのに使用されるDNAベクターであれば特に限定されない。また、PCR産物又はRT-PCR産物のクローニングを簡便に行なうキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Original TA Cloning Kit (Invitrogen製：DNAベクターとしてpCR2.1を使用している。)が好適に使用される。

クローニングしたPCR産物の取得は、所望のPCR産物を含んでいることを確認した形質転換宿主細胞を培養し、該細胞からプラスミドを抽出、精製し、得られたプラスミドから挿入DNA断片を回収することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができる。

好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB培地（1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム）で、30乃至37℃、18時間乃至2日間、振盪しつつ保温することにより行なうことができる。

形質転換宿主細胞の培養物からのプラスミドの調製は、該宿主細胞の菌体を回収し、ゲノムDNAやタンパク質を除去することによりなされる。好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養物からのプラスミドの調製は、マニアティスらのアルカリ法（Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 記載）により行なうことができる。また、より純度の高いプラスミドを得るためのキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Mini Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。さらに、プラスミドの大量調製を行うキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Plasmid Maxi Kit（QIAGEN社製）が好適に使用される。

得られたプラスミドのDNA濃度は、DNA試料を適宜希釈して波長260 nmにおける吸光度を測定し、吸光度1 = DNA 50  $\mu$ g/mlとして算出することができる。DNAの純度は、波長280及び260 nmの吸光度の比率から算出することができる。

核酸プローブの標識は、放射性標識及び非放射性標識に大別される。放射性標識に使用される放射性核種としては、通常使用されるものであれば特に限定されないが、例えば、 $^{32}$ P、 $^{35}$ S、 $^{14}$ C等を挙げることができ、好適には $^{32}$ Pである。非放射性標識に用いる試薬としては、通常核酸の標識に用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、ジゴキシゲニン、ビオチン等が挙げられ、好適にはジゴキシゲニンである。核酸プローブを標識する方法としては、通常使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、標識基質を用いたPCRにより該産物中に取り込ませる方法、ニック・トランスレーション法、ランダム・プライマー法、末端標識法、標識基質を用いてオリゴDNAを合成する方法等を挙げることができ、核酸プローブの種類等によりこれらの方法から適宜選択でき



る。

核酸プローブの塩基配列がML-236B生産菌のゲノム中に存在することは、該生産菌のゲノムDNAを用いたサザンブロット・ハイブリダイゼーションにより確認することができる。

サザンブロット・ハイブリダイゼーションは、マニアティスらの方法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) により行なうことができる。

上述の通り作製された標識核酸プローブを用い、ゲノムDNAライブラリーから目的クローンをスクリーニングすることができる。該スクリーニング法としては、通常遺伝子クローニングに使用される方法であれば特に限定されないが、好適にはコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) を使用することができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションに用いるコロニーの培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができ、好適な宿主細胞である大腸菌の形質転換体の培養は、LB寒天培地 (1% (w/v) トリプトン、0.5% (w/v) イーストエキストラクト、0.5% (w/v) 塩化ナトリウム、1.5% (w/v) アガロース) 上で、30乃至37℃、18時間乃至2日間保温することにより行なうことができる。

コロニー・ハイブリダイゼーションにより得られる陽性クローンからの組換えDNAベクターの調製は、該陽性クローンの培養物からプラスミドを抽出及び精製することによりなされる。

本発明において得られた陽性クローンである形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株は、平成11年 (1999年) 7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1-1-3) に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付された。*E. coli* pML48 SANK71199株が保持する組換えDNAベクターはpML48と命名された。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターが所望のML-236B生合成関連DNAを含んでいることは、該組換えDNAベクターの挿入塩基配列の決定、サザンブロット・ハイブリダイゼーション又は機能発現により確認できる。

DNAの塩基配列は、マキシムーギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymology*, 65, 499 (1980) 記載) 又はジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19, 269 (1982) 記載) 等により決定できる。なお、塩基配列決定に供するプラスミドDNAとしては、より純度の高い標品が好ましい。

pML48の挿入塩基配列は配列表の配列番号1に示される。配列表の配列番号2に示される塩基配列は、配列番号2に示される塩基配列に対して完全に相補的である。通常ゲノムDNAの塩基配列は同種内において遺伝的多型 (ポリモルフィズム: polymorphism) を有している。また、DNAクローニングの過程及び塩基配列決定の過程において、ヌクレオチドの置換等が一定の確率で生じ得る。従って、本発明は、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするML-236B生合成関連DNA、及び配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列を有するDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするML-236B生合成関連DNAをも包含する。これらDNAとしては、配列表の配列番号1又は2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列に1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加が生じたもの、並びにペニシリウム・シトリナム SANK13380株以外のML-236B生産菌に由来するものであり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善する機能を有するものをも包含する。なお、本発明において、ハイブリダイズとは、2本の一本鎖核酸同士が互いに相補的な領域又は相補性の高い領域において二本鎖を形成することをいい、ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション液の組成が6×SSC (1×SSCの組成は、150mMNaCl、15mMクエン酸三ナトリウム。) であり且つハイブリダイゼーションを行なう際の保温温度が55℃の場合

をいう。

ML-236B 生合成関連DNAの解析法は次の1)乃至3)に従う。

#### 1) 遺伝子解析ソフトによる解析

ゲノムDNA配列中の遺伝子領域の推定は、既存の遺伝子解析プログラム (Gene Finding プログラム (以下、「GRAIL」という。))、及び配列の相同性検索プログラム (BLASTN 及び BLASTX) により行うことができる。

GRAIL はゲノム配列の「遺伝子配列らしさ」を評価する7つのパラメータに分割し、それらの結果をニューラルネット法を用いて統合することにより、ゲノムDNA上の構造遺伝子を検索するプログラム (Uberbacher, E. C. & Mural, R. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 11261 (1991) 記載) であり、ApoCom GRAIL Toolkit (APOCOM社製) が好適に使用される。

BLAST は核酸配列及びアミノ酸配列の相同性検索を行なうアルゴリズム (Altechul, S. F., Madden, T. L., et al., Nucl. Acids Res., 25, 3389 (1997) 記載) を用いたプログラムである。

ゲノムDNA配列を適当な長さに分割し、BLASTNを用いて遺伝子データベースに対し相同性検索することにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向を推定することができる。また、分割されたゲノムDNA配列を6つの翻訳フレーム (センス配列及びアンチセンス配列に各々3つずつ) に従ってアミノ酸配列に翻訳し、該アミノ酸配列のペプチド・データベースに対する相同性検索をBLASTXを用いて行なうことにより、被検DNA配列上の構造遺伝子の位置及び方向の推定を行なうこともできる。さらに、真核生物においては、ゲノムDNA配列中に含まれる構造遺伝子のコード領域がイントロン配列により分断されている場合があり、このようなギャップを有する構造遺伝子の解析にはギャップ含有配列用のBLASTがより有効であり、Gapped-BLAST (BLAST2: WISCONSIN GCG package ver. 10.0 に搭載) が好適に使用される。

#### 2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法による解析

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法により、1) 記載の解析法により推定される構造遺伝子の発現を調べることができる。

ノーザンブロットに供するML-236B生産菌の全RNAは、該菌の培養物より得ることができる。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの培養は、該菌のスラントからMGB3-8培地に該菌を接種し、22乃至28℃、1乃至4日間、振盪しつつ保温することにより行うことができる。

ML-236B生産菌からのRNAの抽出は、通常全RNAを調製するのに使用される方法であれば特に限定されないが、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホットフェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられる。また、より純度の高い全RNAを調製するための市販キットとしては、例えば、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社製)等が挙げられる。さらに、mRNAは、全RNAをオリゴ(dT)カラムに添加し、該カラムに吸着した画分を回収することにより得ることができる。

RNAのメンブレンへのトランスファー、プローブの調製、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、上述のサザンブロット・ハイブリダイゼーションと同様に行なうことができる。

### 3) 5'-末端及び3'-末端の解析

各構造遺伝子の5'-末端及び3'-末端の解析は、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により行なうことができる。RACEは、mRNAを鋳型とし、塩基配列が決定されている領域から塩基配列が決定されていない5'-末端又は3'-末端領域までを含むcDNAを、RT-PCRの応用により取得する方法である (Frohman, M. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 8998 (1988) 記載)。

5' RACEは以下の方法に従う。mRNAを鋳型とし、塩基配列中の公知の部分に基づいて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA (1) をプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼにより該cDNA第一鎖の3'-末端にホモポリメリックな (homopolymeric: 単一塩基からなる) ヌクレオチド鎖

を付加させる。該cDNA第一鎖を鋳型とし且つ該ホモポリメリックな塩基配列に相補的な塩基配列を含むセンス側のオリゴDNA、及び、アンチセンス側に存在し且つオリゴDNA (1) より3' - 側に存在するオリゴDNA (2) をプライマーとしたPCRによって、5' - 末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である (Frohman, M. A., Methods in Enzymol., 218, 340 (1993) 記載)。5' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends, Version 2.0 (GIBCO社製) 等が好適に使用される。

3' RACEは、mRNAの3' - 末端に存在するポリA領域を利用する方法である。すなわち、mRNAを鋳型として、オリゴd (T) アダプターをプライマーとした逆転写酵素反応によりcDNA第一鎖を合成した後、該cDNA第一鎖を鋳型として、塩基配列中の公知の部分に基いて設計されたセンス側のオリゴDNA (3)、及び、アンチセンス側のオリゴd (T) アダプターをプライマーとしたPCRによって、3' - 末端領域の二本鎖cDNAを増幅させる方法である。3' RACE用のキットが市販されており、このようなキットとして、例えば、Ready-To-Go T-primed First-Strand Kit (Pharmacia社製) が好適に使用される。

RACEにおける塩基配列中の公知の部分に基いたプライマーの設計には、上記1) 及び2) の解析結果が好適に利用できる。

以上、1) 乃至3) に記載した解析法により、ゲノムDNA配列上の構造遺伝子の方向、並びに、構造遺伝子中の転写開始点の位置、翻訳開始コドンの位置、翻訳終止コドン及びその位置を推定することができる。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子及びそのcDNAを取得することが可能である。

本発明において得られた組換えDNAベクター pML48挿入配列上には、6つの構造遺伝子の存在が推定され、それぞれをm1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cRと命名した。このうち、m1cA、m1cB、m1cE及びm1cRは配列表の配列番号2に示される塩基配列上にコード領域

を有し、m1cC及びm1cDは配列表の配列番号1に示される塩基配列上にコード領域を有しているものと推定された。

cDNAの取得法としては、上述の情報に基づいて設計され得るプライマーを用いたRT-PCRによるクローニング、かかる情報に基いて得られるDNAプローブを用いたcDNAライブラリーからのクローニング等が挙げられる。

これらの方法で取得できるcDNAを機能発現させるためには、完全長のcDNAを得る必要がある。また、RT-PCRにより機能発現し得るcDNAを取得するためには、該RT-PCR産物が本来の位置に翻訳開始コドンを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないようにプライマーを設計することが必須である。

PCR用プライマーX1（XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択され、A1は（13）、C1は（21）、E1は（29）、G1は（37）、I1は（45）、K1は（53）に記載されている。）又はPCR用プライマーY1（YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択され、B1は（17）、D1は（25）、F1は（33）、H1は（41）、J1は（49）、L1は（57）に記載されている。）は配列表の配列番号1又は配列番号2に示される塩基配列中の少なくとも10個の塩基からなる塩基配列を有する。

PCR用プライマーの有する塩基配列は、鋳型鎖と選択的にアニーリングし且つPCR又はRT-PCRのプライマーとして機能し得る限りにおいては、該鋳型鎖の一部と完全に相補的でなくてもよい。

PCR用プライマーX2乃至X4（XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択され、A2は（14）、A3は（15）、A4は（16）、C2は（22）、C3は（23）、C4は（24）、E2は（30）、E3は（31）、E4（32）、G2は（38）、G3は（39）、G4は（40）、I2は（46）、I3は（47）、I4は（48）、K2は（54）、K3は（55）、K4は（56）に記載されている。）はPCR用プライマーX1（X1及びX2乃至X4のXは同じアルファベットのグループを表わす；A1にはA2乃至A4、C1にはC2乃至C4、E1にはE2乃至E4、G1にはG2乃至G4、I1に

はI 2乃至I 4、K 1にはK 2乃至K 4が、それぞれ対応する。)の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーY 2乃至Y 4 (YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択され、B 2は(18)、B 3は(19)、B 4は(20)、D 2は(26)、D 3は(27)、D 4は(28)、F 2は(34)、F 3は(35)、F 4は(36)、H 2は(42)、H 3は(43)、H 4は(44)、J 2は(50)、J 3は(51)、J 4は(52)、L 2は(58)、L 3は(59)、L 4は(60)に記載されている。)はPCR用プライマーY 1 (Y 1及びY 2乃至Y 4のYは同じアルファベットのグループを表わす; B 1にはB 2乃至B 4、D 1にはD 2乃至D 4、F 1にはF 2乃至F 4、H 1にはH 2乃至H 4、J 1にはJ 2乃至J 4、L 1にはL 2乃至L 4が、それぞれ対応する。)の塩基配列と70%以上の相同性を有し、好適には80%以上の相同性を有し、より好適には90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含む。

PCR用プライマーX 1乃至X 4 (XはA、C、E、G、I及びKのいずれかより選択される。)のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4 (YはB、D、F、H、J又はLのいずれかより選択される。)のいずれか一つをプライマーとしてPCR又はRT-PCRを行なうことができる。

上述の通り、本発明において得られた組換えDNAベクター pML 48挿入配列上には、6つの構造遺伝子(m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE及びm1cR)の存在が推定された。これらの6つの構造遺伝子のcDNAは、逆転写反応並びに該PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つによるPCRを組み合わせたRT-PCRにより取得することができる。また、各構造遺伝子は、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとし、ML-236B生産菌のゲノムDNAを鋳型としたPCRにより取得することができる。

完全長であり且つ適当な宿主細胞において発現し得るcDNAを取得するため

のPCR用プライマーとしては、次の①において述べる、PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

① m l c AのcDNAの取得には、PCR用プライマーA 1乃至A 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーB 1乃至B 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c BのcDNAの取得には、PCR用プライマーC 1乃至C 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーD 1乃至D 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c CのcDNAの取得には、PCR用プライマーE 1乃至E 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーF 1乃至F 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c DのcDNAの取得には、PCR用プライマーG 1乃至G 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーH 1乃至H 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c EのcDNAの取得には、PCR用プライマーI 1乃至I 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーJ 1乃至J 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

m l c RのcDNAの取得には、PCR用プライマーK 1乃至K 4のいずれか一つ、及びPCR用プライマーL 1乃至L 4のいずれか一つの組み合わせが好適に使用される。

さらに、PCR用プライマーX 1乃至X 4には以下の②の要件が伴う。

② PCR用プライマーX 1乃至X 4は、該PCR用プライマーX 1乃至X 4のいずれか一つ及びPCR用プライマーY 1乃至Y 4のいずれか一つをプライマーとしたPCR産物が本来の位置に翻訳開始コドンa t gを含み且つ該翻訳開始コドンより開始される翻訳フレーム中には本来の位置以外に翻訳終止コドンを含まないように設計される（なお、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至3



4203に示される塩基配列における、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳開始コドンの位置は、表4に記載されている）。

PCR用プライマーX1はcDNAの翻訳開始コドンatg中のa又はそれより5'側の塩基を5'末端とする。

PCR用プライマーX2乃至X4は配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする（配列表の配列番号2の全塩基配列は、配列表の配列番号1の全塩基配列に対して完全に相補的である。）。

PCR用プライマーX2乃至X4が翻訳開始コドンatgより3'側の塩基配列を含む場合、翻訳開始コドンatgより3'側の塩基配列上に開始コドンatgから始まる翻訳フレーム中に終始コドンとなるような塩基配列（taa、tag又はtga）は含まれない。なお、開始コドンatgから始まる翻訳フレームとは、翻訳開始コドンatgより3'側の塩基配列を翻訳開始コドンatgから3塩基単位に分割したときに生じる3塩基からなる配列をいう。

PCR用プライマーX2乃至X4が、翻訳開始コドンのa、at又はatg（「塩基又は塩基配列m」という。）にその位置で対応する塩基又は塩基配列（「塩基又は塩基配列m'」という。）を含む場合、塩基又は塩基配列mがaのとき、塩基又は塩基配列m'はaであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のaは、該PCR用プライマーX2乃至X4の3'末端に位置する。塩基又は塩基配列mがatのとき、塩基又は塩基配列m'はatであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のatは、該PCR用プライマーX2乃至X4の3'末端に位置する。塩基又は塩基配列mがatgのとき、塩基又は塩基配列m'はatgであり、且つ、塩基又は塩基配列m'のatg中のaを1番目として3'方向に数えて $3 \times n + 1$ （nは1以上の整数）番目のヌクレオチドを5'末端とするトリヌクレオチドが該PCR用プライマーX2乃至X4に存在する場合、該トリヌクレオチドの塩基配列がtaa、tag及びtgaのいずれかであることはない。

PCR用プライマーX2乃至X4の3'末端が、翻訳開始コドンatg中の

a を 1 番目として 3' - 方向に数えて  $3 \times n + 1$  ( $n$  は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該 PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 を一方のプライマーとし、ML-236B 生産菌の RNA 若しくは mRNA を鋳型とする RT-PCR 産物又はゲノム DNA 若しくは cDNA を鋳型とする PCR 産物において、 $3 \times n + 1$  番目のヌクレオチド及びその 3' - 側に隣接するジヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 のいずれか一つの 3' - 末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a を 1 番目として 3' - 方向に数えて  $3 \times n + 2$  ( $n$  は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、該 PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 を一方のプライマーとし、ML-236B 生産菌の RNA 若しくは mRNA を鋳型とする RT-PCR 産物又はゲノム DNA 若しくは cDNA を鋳型とする PCR 産物において、 $3 \times n + 2$  番目のヌクレオチド及びその 3' - 側並びに 5' - 側に隣接する 2 つのモノヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

PCR 用プライマー X 2 乃至 X 4 の 3' - 末端が、翻訳開始コドン a t g 中の a を 1 番目として 3' - 方向に数えて  $3 \times n + 3$  ( $n$  は 1 以上の整数) 番目のヌクレオチドであるとき、 $3 \times n + 1$  乃至  $3 \times n + 3$  番目のヌクレオチドからなるトリヌクレオチドの塩基配列が t a a、t a g 及び t g a のいずれかであることはない。

以上が②の要件である。

また、PCR 用プライマー Y 1 乃至 Y 4 には以下の③の要件が伴う。

③ PCR 用プライマー Y 1 乃至 Y 4 は、PCR 用プライマー X 1 乃至 X 4 のいずれか一つ及び該 Y 1 乃至 Y 4 のいずれか一つをプライマーとする PCR により、各構造遺伝子 (m l c A、m l c B、m l c C、m l c D、m l c E 及び m l c R) にコードされるペプチドの N 末端から C 末端までをコードした cDNA を増幅できるように設計される。

PCR 用プライマー Y 1 は、cDNA 上の翻訳終止領域附近の塩基配列に対し

て相補的な塩基配列を有するPCR用プライマーであれば特に限定されないが、好適には翻訳終止コドンの3'-末端の塩基に対して相補的な塩基又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする塩基配列を有し、より好適には翻訳終止コドンに対して相補的な3塩基の配列を有する（なお、本発明において推定された各構造遺伝子の翻訳終止コドン、該翻訳終止コドンの相補配列、各構造遺伝子にコードされるペプチドのC末端のアミノ酸残基、該アミノ酸残基をコードした塩基配列、並びに、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列及び配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列におけるそれらの位置は、表8乃至10に記載されている）。

PCR用プライマーY2乃至Y4は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上又は配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1乃至34203に示される塩基配列上の特定の領域と選択的にアニーリングする。

以上が③の要件である。

さらに、PCR用プライマーX2乃至X4及びPCR用プライマーY2乃至Y4は、上述の定義及び②及び③記載の要件を満たす限りにおいて、それぞれの5'-末端に適宜塩基配列を付加させることが可能である。そのような塩基配列としては、該プライマーがPCRに使用可能であれば特に限定されないが、例えば、PCR産物についてその後のクローニング操作を行なうのに便利な塩基配列等が挙げられ、このような塩基配列として、制限酵素認識配列及び該制限酵素認識配列を含む塩基配列が挙げられる。

また、PCR用プライマーX1乃至X4及びPCR用プライマーY1乃至Y4の設計は、前述のPCR用プライマーの設計に関する記述に従って行なう。

陽性クローンの保有する組換えDNAベクターの機能発現は、該組換えDNAベクターで細胞を形質転換し、該形質転換細胞のML-236B生産能を測定することにより行なうことができる。機能発現を行なう細胞としては、上述のML-236B生産菌又はML-236B非生産菌を用いることができる。ML-236B非生産菌としては、該DNAベクターで形質転換される細胞であれば特に

限定されないが、例えば、上述のML-236B生産菌の非生産変異株等が挙げられる。該変異株に形質転換することによりML-236Bの生産が回復すれば、該組換えDNAベクターが所望の機能を有すると推定することができる。

機能発現のための形質転換法は、宿主細胞に依存して適宜選択される。好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ペニシリウム・シトリナムの孢子からプロトプラストを調製し、該プロトプラストに組換えDNAベクターを導入することにより行なうことができる (Nara, F., et al., *Curr. Genet.* 23, 28 (1993) 記載)。

プロトプラストの調製は以下の方法による。

ペニシリウム・シトリナムを培養したスラントからPGA寒天培地のプレートへ該菌を接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、該プレートから孢子を回収し、該孢子 $1 \times 10^7$ 乃至 $1 \times 10^9$ 個を50乃至100mlのYPL-20培地 (組成; 0.1% (w/v) イーストエキストラクト (Difco社製)、0.5% (w/v) ポリペプトン (日本製薬 (株) 製)、20% (w/v) ラクトース、pH 5.0) に接種し、22乃至28℃、18時間乃至2日間保温する。該培養物から発芽孢子を回収し、細胞壁分解酵素で処理し、プロトプラストを得る。細胞壁分解酵素としては、ペニシリウム・シトリナムの細胞壁を分解するものであり且つ該菌に有害な作用を及ぼさないものであれば特に限定されないが、例えば、ザイモリアーゼ、キチナーゼ等が挙げられる。

形質転換されたML-236B生産菌の培養は、各宿主細胞に適した条件下で行なうことができるが、好適なML-236B生産菌であるペニシリウム・シトリナムの形質転換体の場合は、ML-236Bを生産させる前に、形質転換された該菌のプロトプラストを適当な条件下で培養することにより予め細胞壁を再生させておく。

該細胞壁の再生は、形質転換したペニシリウム・シトリナムのプロトプラストを封入したVGS中層寒天培地 (組成; Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2% (w/v) 寒天) をVGS下層寒天培地 (組成; Vogel最小培地、2% (w/v) グルコース、1Mグルシトール、2.7% (w/v) 寒

天) 及びVGS上層寒天培地(組成: Vogel最小培地、2%(w/v)グルコース、1Mグルシトール、1.5%(w/v)寒天)で挟み、22乃至28℃、7乃至15日間保温することにより行なうことができる。得られた菌株はPGA培地上で、22乃至28℃で保温しつつ継代培養する。該菌株をPGA培地で作製したスラントに白金耳を用いて接種し、22乃至28℃、10乃至14日間保温し、0乃至4℃で保存する。

上述の通り細胞壁を再生させたペニシリウム・シトリナムの形質転換体を培養したスラントから、MBG3-8培地へ該形質転換体を接種し、22乃至28℃、7乃至12日間、振盪しつつ保温することにより、ML-236Bを効率よく生産することができる。なお、宿主細胞のペニシリウム・シトリナムについても、全く同様の液体培養によりML-236Bを生産させることができる。

ML-236B生産菌の培養物からのML-236Bの精製は、通常天然物の精製に使用される諸技法を組み合わせることによりなされる。該諸技法としては、特に限定されないが、例えば、遠心分離、濾過による固液分離、アルカリ又は酸処理、有機溶媒による抽出、転溶、吸着及び分配等の各種クロマトグラフィー、結晶化等が挙げられる。ML-236Bは、ヒドロキシ酸体とラクトン体の両方の形をとり、相互に変換し、更に、ヒドロキシ酸体は安定な塩を形成する。このような物理化学的特質を利用して、ML-236Bのヒドロキシ酸体(以下、「遊離型ヒドロキシ酸」という。)、ML-236Bのヒドロキシ酸塩(以下、「ヒドロキシ酸塩」という。)、又はML-236Bのラクトン体(以下、「ラクトン」という。)を得ることができる。

該培養物を、加熱下又は常温下でアルカリ加水分解することにより開環し、ヒドロキシ酸塩に変換し、該反応溶液を酸性にした後濾過し、濾液を水と混和しない有機溶媒で抽出することにより、目的化合物を遊離型ヒドロキシ酸として得ることができる。水と混和しない有機溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、メチレンクロリド、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル等のエーテル類、蟻酸エチル、酢酸エチル等のエステル類、

それら2種以上の混合溶媒等が挙げられる。

また、この遊離型ヒドロキシ酸を、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属塩類の水溶液に転溶することにより、目的化合物をヒドロキシ酸塩として得ることができる。

さらに、この遊離型ヒドロキシ酸を、有機溶媒中で加熱して脱水するか、又は他の方法により閉環することにより、目的化合物をラクトンとして得ることができる。

このようにして得ることができる遊離型ヒドロキシ酸、ヒドロキシ酸塩及びラクトンは、カラムクロマトグラフィー等により精製、単離することが可能である。カラムクロマトグラフィーの担体としては、特に限定されるものではないが、例えば、セファデックス LH-20 (Pharmacia社製)、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学(株)製)、シリカゲル、逆相系担体等が挙げられ、好適にはC18系の担体である。

ML-236Bの定量法としては、通常有機化合物の定量に用いられる方法であれば特に限定されないが、例えば、逆相高性能クロマトグラフィー (reverse phase high performance liquid chromatography: 以下、「逆相HPLC」という。) 法等が挙げられる。逆相HPLC法による定量は、ML-236B生産菌の培養物をアルカリ加水分解し、可溶性画分をC18カラムを用いた逆相HPLCに供し、紫外吸収を測定し、該吸収を定量化することにより行なうことができる。C18カラムとしては、通常の逆相HPLCに使用されるC18カラムであれば特に限定されないが、例えば、SSC-ODS-262 (直径6mm、長さ100mm: センシユー科学(株)製) 等が挙げられる。移動相としては、通常逆相HPLCに使用される溶媒であれば特に限定されないが、例えば、75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸等が挙げられる。移動相に流速2ml/分の75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用いてSSC-ODS-262カラムにML-236Bを室温で添加すると、4.0分後に溶出される。ML-236Bの検出は、HPLC用UV検

出器を用いて行なうことができ、UV検出器の吸収波長は、220乃至280 nmであり、好適には220乃至260 nm、より好適には236 nmである。

機能発現が確認された遺伝子を有する所望の組換えDNAベクターは、ML-236Bの生産性の改善に有用である。

なお、本明細書においては、アデニンを「a」、グアニンを「g」、チミンを「t」、シトシンを「c」とそれぞれ記載する。配列表の各配列番号に示される塩基配列は、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン（特許庁刊行、平成10年6月）」に従って記載した。

#### 「図面の簡単な説明」

図1：大腸菌及び糸状菌に導入させることができ且つ長いDNAを挿入することができるDNAベクターpSAKcos1の構築図。

図2：pML48挿入配列の構造遺伝子解析。

図3：pML48挿入配列のノーザンブロット・ハイブリダイゼーション。

#### 「発明を実施するための最良の形態」

以下に実施例及び試験例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 実施例1. pSAKcos1ベクターの作製

1) 大腸菌由来のハイグロマイシンBホスフォトランスフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドpSAK333（特開平3-262486号公報記載）を制限酵素BamHI（宝酒造（株）製）で消化し、T4DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）で末端を平滑化した。

2) DNA ligation kit Ver. 2（宝酒造（株）製）を用いて上記DNA断片を自己環状化し、大腸菌のコンピテント・セルJM109株（宝酒造（株）製）を形質転換した。形質転換大腸菌からBamHI部位を欠失したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAK

360と命名した。

3) pSAK360を制限酵素PvuIIで消化した後、アルカリフォスファターゼ処理を行い、5'末端の脱リン酸化を行なった。コスミドベクターpWE15 (STRATAGENE社製) からコス (cos) 部位を含む [SalI-ScaI] 断片 (約3kb) を取得し、T4 DNAポリメラーゼにより末端を平滑化した後、pSAK360のPvuII部位に連結し、JM109株を形質転換した。該形質転換大腸菌から [SalI-ScaI] 断片 (約3kb) をPvuII部位に挿入したプラスミドを保有する株を選抜し、この株が保有するプラスミドをpSAKcos1と命名した。pSAKcos1は、pWE15由来のBamHI、EcoRI及びNotIの各制限酵素認識部位を1つずつ有する。また、pSAKcos1は選択マーカーとして、アンピシリン耐性遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有している。以下の実施例において、大腸菌を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、40  $\mu$ g/mlのアンピシリンを培地に添加して行なった。ペニシリウム・シトリナム SANK13380を宿主とする場合、pSAKcos1又は外来DNAを挿入したpSAKcos1による形質転換体の選択は、200  $\mu$ g/mlのハイグロマイシンB (hygromycin B) を培地に添加して行なった。

pSAKcos1の構築手順を図1に記載した。

## 実施例2. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAの調製

### 1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の培養

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の種菌の培養はPGA寒天培地を用いたスラントにて行なった。すなわち、ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を白金耳により接種し、26℃にて14日間保温した。このスラントは4℃で保存した。

本培養は、液体通気培養にて行なった。上述のスラント5mm角の菌体を50



mlのMBG3-8培地を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、26℃、210rpmの条件下で5日間振盪培養した。

## 2) ペニシリウム・シトリナム SANK13380株の培養物からのゲノムDNAの調製

1) の培養物を、室温、1000×Gの条件下で10分間遠心分離し、菌体を回収した。湿重量3gの菌体を、ドライアイスで冷却した乳鉢上で粉末になるまで破碎した。菌体破碎物を20mlの62.5mM EDTA・2Na（和光純薬（株）製）-5%（w/v）SDS-50mM Tris（和光純薬（株）製）-塩酸（和光純薬（株）製）緩衝液（pH8.0）で満たした遠心管に入れ、穏やかに混合した後、0℃にて1時間静置した。10mM Tris-塩酸-0.1mM EDTA・2Na（pH8.0：以下「TE」という。）で飽和した10mlのフェノールを添加し、50℃にて1時間穏やかに攪拌した。室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した後、15mlの上層（水相）を別の遠心管にとり、0.5倍容のTE飽和フェノール及び0.5倍容のクロロホルム溶液を加え、2分間穏やかに攪拌した後、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した（以下、「フェノール・クロロホルム抽出」という。）。10mlの上層（水相）に10mlの8M 酢酸アンモニウム（pH7.5）及び25mlの2-プロパノール（和光純薬（株）製）を添加し、-80℃にて15分間冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で10分間遠心分離した。沈澱を5mlのTEに溶解させた後、20μlの10mg/mlリボヌクレアーゼA（Sigma社製）及び250単位のリボヌクレアーゼT1（GIBCO社製）を添加し、37℃にて20分間保温した。これに20mlの2-プロパノールを添加し、穏やかに混合した後、糸状のゲノムDNAをパスツールピペットの先端に巻きつけ、1mlのTEに溶解させた。このDNA溶液に0.1倍容の3M 酢酸ナトリウム（pH6.5）及び2.5倍容のエタノールを加え、-80℃にて15分冷却した後、4℃、10000×Gの条件下で5分間遠心分離した（以下、「エタノール沈澱」という。）。得られた沈澱を200μlのTEに溶解し、ゲノムDNA画分とした。

### 実施例 3. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーの作製

#### 1) ゲノムDNA断片の調製

実施例2において得られたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (50  $\mu$ g) を含む100  $\mu$ lの水溶液に、0.25単位のS a u 3 A I (宝酒造(株)製)を添加した後、10、30、60、90及び120秒経過後に20  $\mu$ lずつサンプリングし、各サンプルに20  $\mu$ lずつの0.5M EDTA (pH 8.0)を加えて制限酵素反応を停止した。アガロースゲル電気泳動により、得られた部分消化DNA断片を分離し、30 kb以上の大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。

回収したゲルを細かく碎き、ウルトラフリーC3遠心式ろ過ユニット(日本ミリポア(株)製)に入れた。-80℃にて15分間冷却し、ゲルを凍結した後、37℃にて10分間保温してゲルを融解した。5000×G、5分間遠心分離し、DNA抽出液を得た。このDNA抽出液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

#### 2) DNAベクター pSAKcos1の前処理

pSAKcos1を制限酵素BamHI(宝酒造(株)社製)により消化した後、65℃にて30分間アルカリフォスファターゼ(宝酒造(株)製)反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

#### 3) ライゲーション及びin vitroパッケージング

上記1)記載のゲノムDNA断片(2  $\mu$ g)及び上記2)記載の前処理済みpSAKcos1(1  $\mu$ g)を混合し、DNA ligation kit Ver. 2(宝酒造(株)製)を用い、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。反応終了液について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を5  $\mu$ lのTEに溶解させた。ライゲーション生成物溶液を、GIGAPAK II Gold (STRATAGENE社製)キッ

トを用いた *in vitro* パッケージングに供し、組換えDNAベクターを含む形質転換大腸菌を得た。形質転換大腸菌のコロニーを形成させたプレートに3 mlのLB培地を注ぎ、セルスクレーパーを用いてプレート上のコロニーを回収した（回収液1という）。さらに3 mlのLB培地でプレートを洗浄、回収した（回収液2という。）。回収液1及び2の混合液にグリセリンを終濃度18%となるよう加えたものを大腸菌菌体液と称し、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNAライブラリーとして、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

実施例4. ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNAを  
鋳型としたPCRによるPKS遺伝子断片の増幅

1) PCR用プライマーの設計及び合成

アスペルギルス・フラヴァス (*Aspergillus flavus*) のPKS遺伝子のアミノ酸配列 (Brown, D. W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418 (1996) 記載) に基づき、配列表の配列番号3及び4に示されるミックス・プライマーを設計した。

配列表の配列番号3 : gayaengentgyasttc

配列表の配列番号4 : tcncenknrcwgtgncc

なお、配列表の配列番号3及び4に示される塩基配列において、nはイノシンの塩基（ヒポキサンチン）を、yはt又はcを、sはg又はcを、kはg又はtを、rはg又はaを、wはa又はtを、それぞれ表わす。

2) PCRによるDNA断片の増幅

上記2) 記載のPCR用プライマー（各100 pmol）、実施例2で得られたペニシリウム・シトリナム SANK 13380株のゲノムDNA（500 ng）、0.2 mM dATP、0.2 mM dCTP、0.2 mM dGTP、0.2 mM dTTP、50 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム及び1.25単位のEx. Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）を含む50  $\mu$ lの反応液を、 $94^{\circ}\text{C}$ にて1分間、 $58^{\circ}\text{C}$ にて2分間、 $70^{\circ}\text{C}$ にて3分間、の連続する3工程からなるサイクル反応に供した。このサイクルを30回繰り返

すことによりDNA断片を増幅した。PCRは、TaKaRa PCR Thermal Cycler MP TP3000（宝酒造（株）製）を使用して行なった。

増幅されたDNA断片を、アガロースゲル電気泳動に供した後、約1.0乃至2.0 kbの大きさをもつDNA断片を含むアガロースゲルを回収した。ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を少量のTEに溶解した。

### 3) ライゲーション及び形質転換

2) で得られたDNA断片、及び、TAクローニング・システムpCR2.1 (Invitrogen社製) を用いて、このキットに含まれるプラスミドpCR2.1にライゲーションし、形質転換株を得た。

得られたクローンを数個選び、マニアティスら (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) の方法に従って培養した。すなわち、2 mlのLB培地を含む24 ml容の試験管に各コロニーを接種し、37℃にて18時間、振盪培養した。

この培養物からの組換えDNAベクターの調製は、アルカリ法 (Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 記載) に従った。すなわち、1.5 mlの培養液を、室温、10000×Gの条件下で2分間遠心分離し、沈澱より菌体を回収した。菌体に100 μlの50 mM グルコース-25 mM Tris-塩酸-10 mM EDTA (pH 8.0) を加えて懸濁し、200 μlの0.2% 規定水酸化ナトリウム-1% (w/v) SDSを加えて穏やかに攪拌し、溶菌させた。これに150 μlの3M 酢酸カリウム-11.5% (w/v) 氷酢酸を加えてタンパク質を変性させ、室温、10000×Gの条件下で10分間遠心分離し、上清を回収した。上清について、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱を行ない、得られた沈澱を40 μg/mlのリボヌクレアーゼA (Sigma社製) を含有する50 μlのTEに溶解させた。

各組換えDNAベクターを制限酵素消化して電気泳動に供し、電気泳動パターンの異なる組換えDNAベクター中の挿入塩基配列を、DNAシーケンサー（モデル377：パーキンエルマー・ジャパン社製）を用いて決定した。

その結果、PKS遺伝子断片を含む組換えDNAベクターを保有する株の存在が確認された。

#### 実施例5. ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノミック・サザンブロットハイブリダイゼーション

##### 1) 電気泳動及びメンブレンへのトランスファー

実施例2において得られたのペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNA (10  $\mu$ g) を、制限酵素EcoRI、SalI、HindIII又はSacI (いずれも宝造(株)製)を用いて消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。アガロースゲルの調製には、Agarose L03「TAKARA」(宝酒造(株)製)を用いた。泳動後、ゲルを0.25規定塩酸(和光純薬(株)製)に浸し、室温にて10分間穏やかに振盪した。このゲルを0.4規定水酸化ナトリウム(和光純薬(株)製)中に移し、室温にて30分間穏やかに振盪した。マニアティスらのアルカリトランスファー法(Maniatis, T., et al., Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)記載)により、ゲル中のDNAをナイロン・メンブレンHybond™-N+ (アマシャム社製)にトランスファーし、固定した。メンブレンを2×SSC (1×SSCの組成は、150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)で洗浄した後風乾した。

##### 2) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

1) で得られたメンブレンに対し、実施例4で得られたPKS遺伝子断片をプローブとして用いたハイブリダイゼーションを行なった。

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1  $\mu$ g) をDIG DNA Labelling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものをを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIG イーザーハイブ: ベーリンガー・マンハイム社製) に 1) 記載のメンブレンを浸し、20 rpm で振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に添加し、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製) を用い、20 rpm で振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた55℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製) で処理し、X線フィルム (ルミフィルム: ベーリンガー・マンハイム社製) に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A (Fujifilm社製) を用いて行なった。

その結果、実施例4において得られたPKS遺伝子断片はペニシリウム・シトリナムのゲノム上に存在することが確認された。

#### 実施例6. PKS遺伝子断片をプローブとしたペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

PKS遺伝子を含むゲノムDNAのクローニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行なった。

##### 1) メンブレンの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株のゲノムDNAライブラリーとして保存した大腸菌菌体液 (実施例3記載) を、LB寒天培地のプレートに、プレート1枚あたり5000乃至10000個のコロニーが生育するよう希釈して撒いた。このプレートを26℃にて18時間保温した後、4℃にて1時間冷却した。Hybond™-N+ (アマシャム社製) をプレートにのせ、1分間接触させた。コロニーを付着させたメンブレンをプレートから注意深く離し、コロニー接触面を上にして、200mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5規定

水酸化ナトリウムに7分、200 mlの1.5M 塩化ナトリウム-0.5M Tris-塩酸-1mM EDTA (pH 7.5)に3分ずつ2回浸した後、400 mlの2×SSCで洗浄した。洗浄したメンブレンを30分風乾した。

## 2) ハイブリダイゼーション

プローブには、実施例4において得られたPKS遺伝子断片DNA (1 μg)をDIG DNA Labeling Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)で標識し、使用直前に10分間煮沸後急冷したものを用いた。

ハイブリダイゼーション液 (DIGイーザーハイブ:ベーリンガー・マンハイム社製)に1)記載のメンブレンを浸し、20 rpmで振盪しつつ、42℃にて2時間プレハイブリダイゼーションを行なった後、上述の標識プローブをハイブリダイゼーション液に加え、マルチシェーカー・オープンHB (TAITEC社製)を用い、20 rpmで振盪しつつ42℃にて18時間ハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションを行なったメンブレンについて、2×SSCを用いた室温、20分間の洗浄を3回、0.1×SSCを用いた68℃、30分間の洗浄を2回、それぞれ行なった。

洗浄したメンブレンをDIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids (ベーリンガー・マンハイム社製)で処理し、X線フィルム (ルミフィルム:ベーリンガー・マンハイム社製)に露光した。感光は富士メディカルフィルムプロセサーFPM800A: Fuji Film社製)を用いて行なった。

以上、1)及び2)記載の操作をスクリーニングという。

一回目のスクリーニングで陽性シグナルが検出されたクローンのコロニー周辺をかきとってLB培地に懸濁した後、適宜希釈してプレートに撒いて培養し、同様に二回目のスクリーニングを行ない、陽性クローンを純化した。

なお、本実施例で得られた陽性クローン、すなわち形質転換大腸菌 E. coli pML48 SANK71199は、平成11年(1999年)7月7日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東町1丁目1番3号)に国際寄託され、受託番号FERM BP-6780を付さ

れた。

#### 実施例 7. 組換え DNA ベクター pML 48 の挿入配列の解析 (1)

実施例 6 で得られた *E. coli* pML 48 SANK 71199 株の培養及び該培養物からの組換え DNA ベクターの調製は、実施例 4 記載の方法に準じて行なった。

得られた組換え DNA ベクターを pML 48 と命名した。pML 48 挿入配列を各種制限酵素消化し、pUC119 (宝酒造 (株) 製) に組込むことにより、サブクローニングした。得られたサブクローンをプローブとして、実施例 5 記載の方法に準じてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行なった。すなわち、pML 48 の各種制限酵素消化物を電気泳動に供し、DNA をメンブレンへトランスファーしたもののに対して、ハイブリダイゼーションを行なった。

その結果、pML 48 挿入配列の制限酵素地図が作成された。

また、上述の各サブクローンの挿入配列の塩基配列を、DNA シークエンサーモデル 377 (パーキンエルマー・ジャパン社製) を用いて決定し、pML 48 の全塩基配列を決定した。

pML 48 の挿入配列は全 34203 塩基であった。

pML 48 の挿入配列の塩基配列は、配列表の配列番号 1 及び 2 に記載されている。配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

該挿入配列上の構造遺伝子の存在について、遺伝子検索プログラム GRAIL (ApoCom GRAIL Toolkit: APOCOM 社製) 及び相同性検索プログラム BLAST (Gapped-BLAST (BLAST2): WISCONSIN GCG package ver. 10.0 に搭載) を用いて解析した。

その結果、pML 48 の挿入塩基配列中には、6 種類の異なる構造遺伝子の存在が推定され、それぞれを m1cA、m1cB、m1cC、m1cD、m1cE 及び m1cR と命名した。また、m1cA、m1cB、m1cE 及び m1cR は



配列表の配列番号2記載の塩基配列中に、m1cC及びm1cDは配列表の配列番号1に示される塩基配列中に、それぞれコード領域を有していることが推定された。さらに、該挿入配列における各推定構造遺伝子の相対的位置及び大きさが推定された。

本実施例の結果を図2に記載した。

#### 実施例8、組換えDNAベクターpML48の挿入配列の解析(2)

ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション法及びRACEにより、実施例7において存在が示唆された構造遺伝子の発現解析、及び5' -末端並びに3' -末端領域の解析を行なった。

##### 1) ペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラント(実施例2記載)より5mm角の菌体を10mlのMGB3-8培地を入れた100ml容の三角フラスコに接種し、26℃にて3日間、振盪培養した。

培養物からの全RNAの調製は、グアニジン・イソチオシアネート法を利用したRNeasy Plant Mini Kit(キアゲン社製)を用いて行った。すなわち、培養物を、室温、5000×Gの条件下で10分間遠心分離して菌体を回収し、湿重量2gの菌体を液体窒素により凍結した後、乳鉢上で粉末になるまで破碎した。この破碎物をグアニジン・イソチオシアネートを含む4mlの菌体溶解バッファー(このキットに含まれる。)に懸濁した。懸濁液をこのキットに含まれるQIAshredderスピンカラム10本に450μlずつ分注し、室温、1000×G、10分間遠心分離した後、溶出液をそれぞれ回収した。各溶出液に225μlのエタノールを加えた後、このキットに含まれるRNAミニスピンカラムに添加した。このカラムをこのキットに含まれる洗浄用緩衝液で洗浄した後、50μlずつのリボヌクレアーゼ・フリー蒸留水で吸着物を溶出させ、溶出液を全RNA画分とした。

##### 2) ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

20μgのペニシリウム・シトリナム SANK13380の全RNAを含む

2. 25  $\mu$ l の水溶液に、1  $\mu$ l の 10  $\times$  MOPS (組成 ; 200 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸、50 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA  $\cdot$  2Na、pH 7.0 ; 121 $^{\circ}$ Cにて20分間オートクレーブ滅菌してから使用した。 ; 同仁化学研究所 (株) 製)、1.75  $\mu$ l のホルムアルデヒド及び5  $\mu$ l のホルムアミドを添加して混合し、RNAサンプルとした。このRNAサンプルを、65 $^{\circ}$ Cにて10分間保温した後、氷水中で急冷し、アガロースゲル電気泳動に供した。電気泳動のゲルは、10 ml の 10  $\times$  MOPS 及び 1 g の Agarose L03「TAKARA」(宝酒造 (株) 製) を 72 ml のピロカルボン尼克・アシッド・ジエチルエステル (Sigma 社製) 処理水に混合し、加熱してアガロースを溶解させた後冷却させ、1.8 ml のホルムアルデヒドを添加することにより作製した。サンプルバッファーは、1  $\times$  MOPS (10  $\times$  MOPS を水で 10 倍希釈したもの。) を使用した。ゲル中の RNA を、10  $\times$  SSC 中で Hybond<sup>TM</sup>-N+ (アマシャム社) へトランスファーした。

プローブには、pML48 挿入配列を下記表 1 記載の制限酵素 1 及び 2 で消化することにより得られる DNA 断片 (a、b、c、d 及び e) を用いた。

表 1. ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションのプローブ

プロ ーブ	制限 酵素 1	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*	制限 酵素 2	制限酵素認識部位の ヌクレオチド番号*
a	EcoRI	6319~6324	EcoRI	15799~15804
b	BamHI	16793~16798	PstI	18164~18169
c	KpnI	26025~26030	BamHI	27413~27418
d	SalI	28691~28696	SalI	29551~29556
e	HindIII	33050~33055	SacI	34039~34044

\*各ヌクレオチド番号は、配列表の配列番号 1 に基く。

プローブの標識、ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出は、実施例 5 のサザンブロット・ハイブリダイゼーションに従って行なった。

本実施例の結果を図3に記載した。

各シグナルは各プローブの塩基配列と相同な転写産物の存在を示す。

本実施例でpML48挿入配列上に存在が推定された6つの構造遺伝子のうち、mlcB、mlcD、mlcE及びmlcRはペニシリウム・シトリナム SANK13380株内で転写されていることが確認され、mlcA及びmlcCについても該細胞内で転写されていることが示唆された。

各シグナルの位置は、転写産物の相対的なサイズを示すものではない。

### 3) 5' RACEによる5'-末端配列の決定

各構造遺伝子の5'-末端領域を含むcDNAの取得は、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO社製)を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり且つ該遺伝子の5'-末端近傍に位置すると考えられる塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNAを2種類作製した。

表2に、各構造遺伝子の、より3'-側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA(1)の塩基配列を、表3に、より5'-側に位置する塩基配列に基いて設計されたアンチセンス側のオリゴDNA(2)の塩基配列を、それぞれ記載した。

表2. 5' RACEによる5'-末端配列解析に用いるオリゴDNA(1)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 5 : gcatgttcaatttgcctc
mlcB	配列番号 6 : ctggatcagacttttctgc
mlcC	配列番号 7 : gtcgcagtagcatgggc
mlcD	配列番号 8 : gtcagagtgatgctcttctc
mlcE	配列番号 9 : gttgagaggattgtgagggc
mlcR	配列番号 10 : ttgcttgtgttgattgtc

表 3. 5' RACEによる5' -末端配列解析に用いるオリゴDNA (2)

遺伝子	配列表の配列番号：塩基配列
mlcA	配列番号 1 1 : catggtactctcgcccgttc
mlcB	配列番号 1 2 : ctccccagtagtaagctc
mlcC	配列番号 1 3 : ccataatgagtgtgactgttc
mlcD	配列番号 1 4 : gaacatctgcatccccgtc
mlcE	配列番号 1 5 : ggaaggcaaagaaagtgtac
mlcR	配列番号 1 6 : agattcattgctgttggtc

オリゴDNA (1) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株の全RNAを鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。すなわち、1  $\mu$ gの全RNA、2.5 pmolのオリゴDNA (1)、1  $\mu$ lのSUPER SCRIPT™ II reverse transcriptase (このキットに含まれる。)を含む24  $\mu$ lの反応液を、16℃にて1時間保温した後、生成物をこのキットに含まれるGLASSMAXスピナートリッジに添加してcDNA第一鎖を精製した。

cDNA第一鎖の3' -末端に、このキットに含まれるterminal deoxyribonucleotidyl transferaseによりポリC鎖を付加させた。

3' -末端にポリC鎖の付加したcDNA第一鎖、40 pmolのオリゴDNA (2) 及び40 pmolのAbridged Anchor Primer (このキットに含まれる) を含む50  $\mu$ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分間、4℃にて1.8時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてpCR2.1を用いてクローニングした。

以上の操作を 5' RACE という。

5' -末端を含む cDNA 断片の塩基配列を決定し、転写開始点及び翻訳開始コドンの位置を推定した。

5' RACE により得られた各構造遺伝子に対応する 5' -末端 cDNA 断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表 4 に表示した。また、表 5 に、各構造遺伝子の転写開始点及び翻訳開始の存在する配列番号、転写開始点の位置及び翻訳開始点の位置を記載した。

表 4. 各 5' -末端 cDNA 断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号 17
mlcB	配列番号 18
mlcC	配列番号 19
mlcD	配列番号 20
mlcE	配列番号 21
mlcR	配列番号 22

表 5. 各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始コドンの位置

表 5. 各遺伝子の転写開始点及び翻訳開始点の位置				
遺伝子	翻訳開始コドンの	配列番号 1 又は 2 におけるヌクレオチド		
番号	存在する配列番号 *	転写開始点	翻訳開始コドン	
mlcA	配列番号 2	2 2 9 1 3	2 3 0 4 5 ~ 2 3 0 4 7	
mlcB	配列番号 2	1 1 6 8 9	1 1 7 4 8 ~ 1 1 7 5 0	
mlcC	配列番号 1	1 1 6 4 1	1 1 7 9 6 ~ 1 1 7 9 8	
mlcD	配列番号 1	2 4 0 6 6	2 4 3 2 1 ~ 2 4 3 2 3	
mlcE	配列番号 2	3 3 9 9	3 5 4 5 ~ 3 5 4 7	
mlcR	配列番号 2	3 6 5	4 0 0 ~ 4 0 2	

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的であ

る。

#### 4.) 3' RACEによる3'-末端配列の決定

各構造遺伝子の3'-末端領域を含むcDNAの取得は、Ready To Go: T-Primed First-Strand kit (ファルマシア社製) を用いて行なった。

実施例7及び本実施例の2)の結果より推定されたpML48の挿入塩基配列上の各構造遺伝子において、コード領域であり、構造遺伝子の3'-末端近傍に位置すると考えられるセンス側のオリゴDNA (3) を1種類ずつを作製した。

表6に各構造遺伝子について作製したオリゴDNA (3) の塩基配列を表示した。

表6. 3' RACEによる3'-末端配列解析に用いるオリゴDNA (3)

遺伝子	配列表の配列番号: 塩基配列
mlcA	配列番号 23 : atcataccatcttcaacaac
mlcB	配列番号 24 : gctagaatagggttacaagcc
mlcC	配列番号 25 : acattgccaggcacccagac
mlcD	配列番号 26 : caacgcccagctgccaatc
mlcE	配列番号 27 : gtcttttctactatctacc
mlcR	配列番号 28 : ctttcccagctgctactatc

オリゴDNA (3) をプライマーとし、ペニシリウム・シトリナム SANK 13380株の全RNA (1  $\mu$ g) を鋳型とした逆転写反応によりcDNA第一鎖を合成した。

cDNA第一鎖、40 pmolのオリゴDNA (3) 及びNotI-d (T) 18プライマー (このキットに含まれる。) を含む100  $\mu$ lの反応液を、94℃にて2分間保温し、続いて、94℃にて30秒、55℃にて30秒、及び、72℃にて2分間を1サイクルとする反応を35回行なった後、72℃にて5分

間、4℃にて18時間保温した。得られた産物をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルからDNAを回収し、フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により産物を精製し、実施例4記載の方法に準じてPCR2.1を用いてクローニングした。

以上の操作を3' RACEという。

得られたcDNAの3' -側断片の塩基配列を決定し、翻訳終止コドンの位置を推定した。

3' RACEにより得られた各構造遺伝子に対応する3' -末端cDNA断片の塩基配列を記載した配列表の配列番号を表7にまとめた。また、表8に、各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該コドンの位置を配列表の配列番号1又は2に基づいて記載した。

表7. 各3' -末端cDNA断片の塩基配列を示した配列表の配列番号

遺伝子	配列表の配列番号
mlcA	配列番号29
mlcB	配列番号30
mlcC	配列番号31
mlcD	配列番号32
mlcE	配列番号33
mlcR	配列番号34

表8. 各構造遺伝子の翻訳終止コドン及び該翻訳終止コドンの位置

遺伝子	翻訳終止 コドン	翻訳終止コドンの 存在する配列番号*	配列番号1又は2における 翻訳終止コドンのヌクレオ チド番号
mlcA	tag	配列番号2	32723～32725
mlcB	taa	配列番号2	19840～19842
mlcC	taa	配列番号1	13479～13481

mlcD	tga	配列番号 1	2 7 8 9 0 ~ 2 7 8 9 2
mlcE	tga	配列番号 2	5 7 3 0 ~ 5 7 3 2
mlcR	tag	配列番号 2	1 9 1 5 ~ 1 9 1 7

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

さらに、各構造遺伝子がコードすると推定されるポリペプチドの C 末端のアミノ酸残基、そのアミノ酸残基をコードするトリヌクレオチドの塩基配列及びそのトリヌクレオチドの位置を表 9 に記載した。

表 9. 各構造遺伝子のコードするポリペプチドの C 末端アミノ酸

遺 伝 子	C 末端 アミノ 酸残基	該アミノ酸をコー ドするトリヌクレ オチドの塩基配列	該トリヌクレ オチドの存在 する配列番号*	配列番号 1 又は 2 にお ける該トリヌクレオチ ドのヌクレオチド番号
mlcA	アラニン	gcc	配列番号 2	32720 ~ 32722
mlcB	セリン	agt	配列番号 2	19837 ~ 19839
mlcC	システイン	tgc	配列番号 1	13476 ~ 13478
mlcD	アルギニン	cgc	配列番号 1	27887 ~ 27889
mlcE	アラニン	gct	配列番号 2	5727 ~ 5729
mlcR	アラニン	gct	配列番号 2	1912 ~ 1914

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

また、表 8 記載の翻訳終止コドンに対する相補配列、該相補配列の存在する配列番号、及び、該相補配列の位置を表 10 にまとめた。

表 10. 各構造遺伝子の翻訳終始コドンに対する相補配列

遺伝子	翻訳終始コドン	該相補配列の存在	配列番号 1 又は 2 におけ
-----	---------	----------	-----------------



に対する相補配 する配列番号 *		る該相補配列のヌクレオ チド番号	
列			
mlcA	cta	配列番号 1	1 4 7 9 ~ 1 4 8 1
mlcB	tta	配列番号 1	1 4 3 6 2 ~ 1 4 3 6 4
mlcC	tta	配列番号 2	2 0 7 2 3 ~ 2 0 7 2 5
mlcD	tca	配列番号 2	6 3 1 2 ~ 6 3 1 4
mlcE	tca	配列番号 1	2 8 4 7 2 ~ 2 8 4 7 4
mlcR	cta	配列番号 1	3 2 2 8 7 ~ 3 2 2 8 9

\* 配列表の配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列は、互いに、完全に相補的である。

以上の通り、各構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。これらの情報に基づいて、各構造遺伝子の転写産物及び翻訳産物を取得することが可能である。

#### 実施例 9. 組換え DNA ベクター pML 48 を用いたペニシリウム・シトリナムの形質転換

ペニシリウム・シトリナムの形質転換は、ナラらの方法 (Nara, F., et al., Curr. Genet. 23, 28 (1993) 記載) に従った。

##### 1) プロトプラストの調製

ペニシリウム・シトリナム SANK 13380 株を培養したスラントより、白金耳を用いて PGA 寒天培地に接種し、26℃にて14日間保温した。該培養物よりペニシリウム・シトリナム SANK 13380 株の胞子を回収し、 $1 \times 10^8$  個の胞子を 80 ml の YPL-20 培地に接種し、26℃にて1日間保温した。胞子の発芽を顕微鏡観察により確認した後、発芽胞子を、室温、5000 × G の条件下で10分間遠心分離して胞子を沈澱として回収した。胞子を滅菌水で3回洗浄した後、プロトプラスト化を行なった。すなわち、200 mg のザイモリアーゼ 20 T (生化学工業 (株) 製) 及び100 mg のキチナーゼ (Sig

ma 社製) を 10 ml の 0.55 M 塩化マグネシウムに溶解し、室温、5000 × G の条件下で 10 分間遠心分離して得られた上清を酵素液とし、20 ml の酵素液及び湿重量 0.5 g の発芽胞子を 100 ml 容三角フラスコに入れ、30 °C にて 60 分間穏やかに振盪し、発芽胞子がプロトプラスト化したことを顕微鏡観察により確認した後、反応液を 3 G-2 ガラスフィルター (HARIO 社製) で濾過した。該濾液を、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離し、プロトプラストを沈殿として回収した。

## 2) 形質転換

1) で得られたプロトプラストを 30 ml の 0.55 M 塩化マグネシウム溶液で 2 回、30 ml の 0.55 M 塩化マグネシウム-50 mM 塩化カルシウム-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3 : 以下、「MCM 溶液」という。) で 1 回それぞれ洗浄し、100 μl の 4% (w/v) ポリエチレングリコール 8000-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸-0.0025% (w/v) ヘパリン (Sigma 社製)-50 mM 塩化マグネシウム (pH 6.3 : 以下、「形質転換用溶液」という。) に懸濁した。約  $5 \times 10^7$  個のプロトプラストを含む 96 μl の形質転換溶液及び 120 μg の pML48 DNA を含む 10 μl の TE を混合し、氷上で 30 分間静置した。これに 1.2 ml の 20% (w/v) ポリエチレングリコール-50 mM 塩化マグネシウム-10 mM 3-モルフォリノプロパンスルホン酸 (pH 6.3) を加えて穏やかにピペッティングし、室温、20 分間静置した。これに 10 ml の MCM 溶液を加えて穏やかに混合し、室温、1000 × G の条件下で 10 分間遠心分離した。沈殿より形質転換プロトプラストを回収した。

## 3) 形質転換プロトプラストにおける細胞壁の再生

2) で得られた形質転換プロトプラストを 5 ml の液状の VGS 中層寒天培地に懸濁し、固化した 10 ml の VGS 下層寒天培地プレートに重層した。該プレートを、26 °C にて 1 日間培養した後、プレート 1 枚につき 5 mg のハイグロマイシン B (Hygromycin B : Sigma 社製) を含む 10 ml の液状の VGS 上層寒天培地を重層した (ハイグロマイシン B の終濃度は 200 μg/

ml)。26℃にて14日間保温して得られた菌株を、200 $\mu$ g/mlのハイグロマイシンBを含有するPGA寒天培地上で継代培養した後、PGA寒天培地で作製したスラントに植え継ぎ、26℃にて14日間保温した。

これを形質転換株という。

該スラントは4℃で保存した。

#### 試験例1. 形質転換株及び親株の有するML-236B生産能の比較

実施例9において得られた形質転換株及び親株ペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養し、該培養物中のML-236B量を測定した。

形質転換株を培養したスラント（実施例9記載）又はペニシリウム・シトリナム SANK13380株を培養したスラント（実施例2記載）より5mm角の菌体を、10mlのMBG3-8培地を入れた100ml容の三角フラスコに接種し、26℃にて2日間、振盪培養した後、3.5mlの50% (w/v) グリセリン溶液を添加し、さらに26℃にて10日間、振盪培養した。

該培養物10mlに50mlの0.2規定水酸化ナトリウムを加え、26℃にて1時間、振盪しつつ保温した後、室温、3000 $\times$ Gの条件下で2分間遠心分離し、1mlの上清を回収し、9mlの50%メタノールと混合してHPLCに供した。

HPLCのカラムには、SSC-ODS-262（直径6mm、長さ100mm；センシュウ科学（株）製）を用い、移動相には75% (v/v) メタノール-0.1% (v/v) トリエチルアミン-0.1% (v/v) 酢酸を用い、室温にて2ml/分の流速で溶出した。これら条件下において、ML-236Bはカラム添加後4.0分に溶出された。検出はUV検出器の吸収波長を236nmに設定して行なった。

形質転換株のうちML236B生産能の改善された株が5つ得られ、これらの生産能は親株より平均12%高かった。

この5株のML-236B生産能は、モノスポア処理等の継代を行なった後も安定に維持された。

「産業上の利用の可能性」

本発明においてML-236B生産菌より得られたDNAは、該生産菌内に導入されることにより該生産菌のML-236B生産能を改善する。

また、該DNA上に6つの構造遺伝子の存在、その方向及びその位置が明らかとなった。本発明により、それぞれの構造遺伝子に対応するcDNAを取得することが可能になる。

## 請求の範囲

1. 配列表の配列番号1のヌクレオチド番号1乃至34203で示される塩基配列を含むことからなり、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
2. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) より得ることができる、請求項1記載のDNA。
3. 請求項1又は2記載のDNAとハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
4. 請求項1又は2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ML-236B生産菌内に導入されることにより該菌のML-236B生産能を改善することを特徴とするDNA。
5. 請求項1乃至4のいずれか一つに記載のDNAを含む組換えDNAベクター。
6. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199株 (FERM BP-6780) に保持される、請求項5記載の組換えDNAベクター。
7. 請求項5又は6記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。
8. ML-236B生産菌であることを特徴とする請求項7記載の宿主細胞。
9. ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) であることを特徴とする、請求項8記載の宿主細胞。
10. 請求項8又は9記載の宿主細胞を培養し、次いで該培養物からML-236Bを回収することを特徴とする、ML-236Bの製造法。
11. 大腸菌であることを特徴とする、請求項7記載の宿主細胞。
12. 形質転換大腸菌 *E. coli* pML48 SANK71199 (FERM BP-6780) である、請求項11記載の宿主細胞。
13. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号23045のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーA1。

14. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA2

(但し、該PCR用プライマーA2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

15. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA3

(但し、該PCR用プライマーA3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

16. 請求項13記載のPCR用プライマーA1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーA4

(但し、該PCR用プライマーA4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号23045乃至23047によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

17. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号1479のシトシン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーB1。

18. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と70%以上の相同性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB2

(但し、該PCR用プライマーB2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

19. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と80%以上の相同

性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB3

(但し、該PCR用プライマーB3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

20. 請求項17記載のPCR用プライマーB1の塩基配列と90%以上の同一性を有する、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーB4

(但し、該PCR用プライマーB4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号32720乃至32722によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

21. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号11748のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーC1。

22. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC2

(但し、該PCR用プライマーC2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

23. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC3

(但し、該PCR用プライマーC3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

24. 請求項21記載のPCR用プライマーC1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーC4

(但し、該PCR用プライマーC4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号11748乃至11750によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

25. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号14362のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーD1。

26. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD2

(但し、該PCR用プライマーD2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

27. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と80%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD3

(但し、該PCR用プライマーD3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

28. 請求項25記載のPCR用プライマーD1の塩基配列と90%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーD4

(但し、該PCR用プライマーD4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号19837乃至19839によりコードされるセリン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

29. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号11796のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を有するPCR用プライマーE1。

30. 請求項29記載のPCR用プライマーE1の塩基配列と70%以上の同一性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーE2

(但し、該PCR用プライマーE2が、配列表の配列番号1のヌクレオチド番



号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 1. 請求項 2 9 記載の P C R 用プライマー E 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー E 3

(但し、該 P C R 用プライマー E 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 2. 請求項 2 9 記載の P C R 用プライマー E 1 の塩基配列と 9 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー E 4

(但し、該 P C R 用プライマー E 4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 1 7 9 6 乃至 1 1 7 9 8 によりコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 3. 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 2 0 7 2 3 のチミン又はそれより 5' - 側の塩基を 5' - 末端とする、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を有する P C R 用プライマー F 1。

3 4. 請求項 3 3 記載の P C R 用プライマー F 1 の塩基配列と 7 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー F 2

(但し、該 P C R 用プライマー F 2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする c D N A を増幅させるための P C R に用いられ得る)

3 5. 請求項 3 3 記載の P C R 用プライマー F 1 の塩基配列と 8 0 % 以上の相同性を有し、少なくとも 1 0 個の塩基からなる配列を含む P C R 用プライマー F 3

(但し、該 P C R 用プライマー F 3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 1 3 4 7 6 乃至 1 3 4 7 8 によりコードされるシステイン残基を C 末端とする

ポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)

36. 請求項 33 記載の PCR 用プライマー F1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー F4

(但し、該 PCR 用プライマー F4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 13476 乃至 13478 によりコードされるシステイン残基を C 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)

37. 配列表の配列番号 1 において、ヌクレオチド番号 24321 のアデニン又はそれより 5' 側の塩基を 5' 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を有する PCR 用プライマー G1。

38. 請求項 37 記載の PCR 用プライマー G1 の塩基配列と 70% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G2

(但し、該 PCR 用プライマー G2 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 24321 乃至 24323 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

39. 請求項 37 記載の PCR 用プライマー G1 の塩基配列と 80% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G3

(但し、該 PCR 用プライマー G3 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 24321 乃至 24323 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

40. 請求項 37 記載の PCR 用プライマー G1 の塩基配列と 90% 以上の相同性を有し、少なくとも 10 個の塩基からなる配列を含む PCR 用プライマー G4

(但し、該 PCR 用プライマー G4 が、配列表の配列番号 1 のヌクレオチド番号 24321 乃至 24323 でコードされるメチオニン残基を N 末端とするポリペプチドをコードする cDNA を増幅させるための PCR に用いられ得る)。

41. 配列表の配列番号 2 において、ヌクレオチド番号 6312 のチミン又はそれより 5' 側の塩基を 5' 末端とする、少なくとも 10 個の塩基からなる配

列を含むPCR用プライマーH1。

42. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH2

(但し、該PCR用プライマーH2は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

43. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH3

(但し、該PCR用プライマーH3は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

44. 請求項41記載のPCR用プライマーH1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーH4

(但し、該PCR用プライマーH4は、配列表の配列番号1のヌクレオチド番号27887乃至27889でコードされるアルギニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

45. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号3545のアデニン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI1。

46. 請求項45記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI2

(但し、該PCR用プライマーI2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

47. 請求項45記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI3

(但し、該PCR用プライマーI3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペ

チドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

48. 請求項45記載のPCR用プライマーI1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーI4

(但し、該PCR用プライマーI4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号3545乃至3547でコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

49. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号28472のチミン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ1。

50. 請求項49記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ2

(但し、該PCR用プライマーJ2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

51. 請求項49記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ3

(但し、該PCR用プライマーJ3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

52. 請求項49記載のPCR用プライマーJ1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーJ4

(但し、該PCR用プライマーJ4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号5727乃至5729によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

53. 配列表の配列番号2において、ヌクレオチド番号400のアデニン又はそれより5'側の塩基を5'末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK1。

54. 請求項53記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と70%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK2

(但し、該PCR用プライマーK2が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

55. 請求項53記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK3

(但し、該PCR用プライマーK3が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

56. 請求項53記載のPCR用プライマーK1の塩基配列と90%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーK4

(但し、該PCR用プライマーK4が、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号400乃至402によりコードされるメチオニン残基をN末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

57. 配列表の配列番号1において、ヌクレオチド番号32287のシトシン又はそれより5'-側の塩基を5'-末端とする、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL1。

58. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と70%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL2

(但し、該PCR用プライマーL2は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

59. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と80%以上の相同性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL3

(但し、該PCR用プライマーL3は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

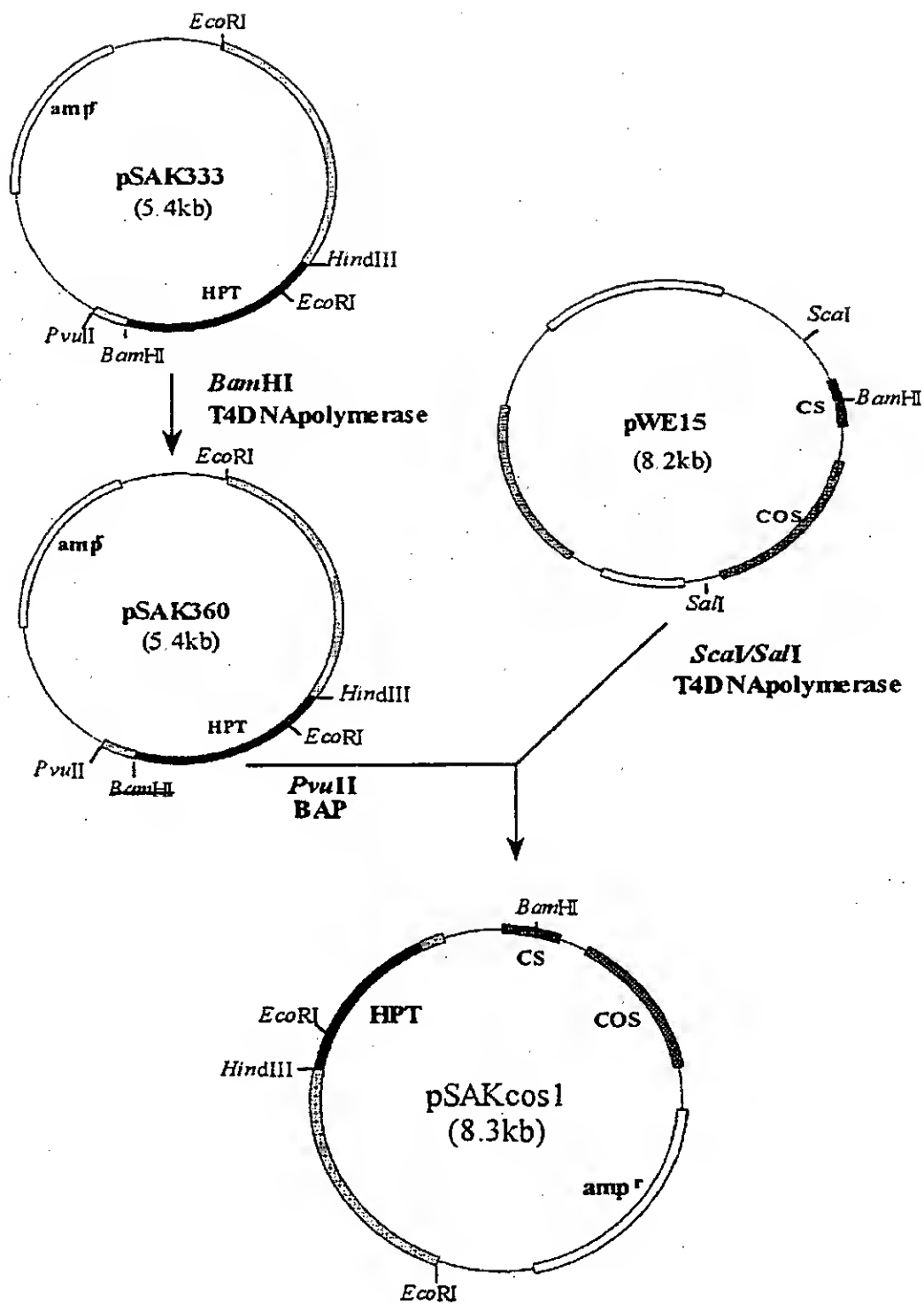
60. 請求項57記載のPCR用プライマーL1の塩基配列と90%以上の相同

性を有し、少なくとも10個の塩基からなる配列を含むPCR用プライマーL4

(但し、該PCR用プライマーL4は、配列表の配列番号2のヌクレオチド番号1912乃至1914によりコードされるアラニン残基をC末端とするポリペプチドをコードするcDNAを増幅させるためのPCRに用いられ得る)。

1/3

【図 1】

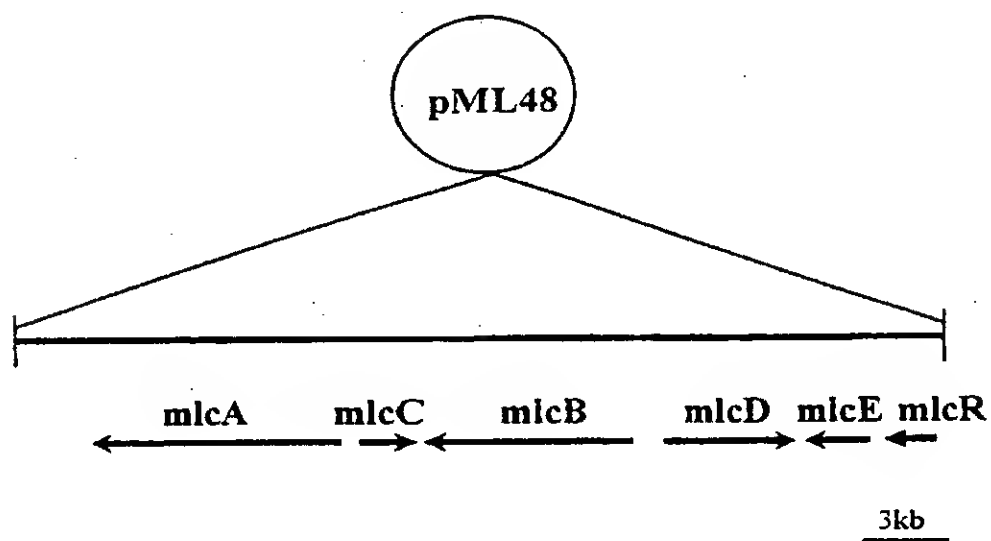






【図 2】

pML48 挿入配列上の推定構造遺伝子(mlcA,mlcB,mlcC,mlcD,mlcE,mlcR)の位置、大きさ及び方向

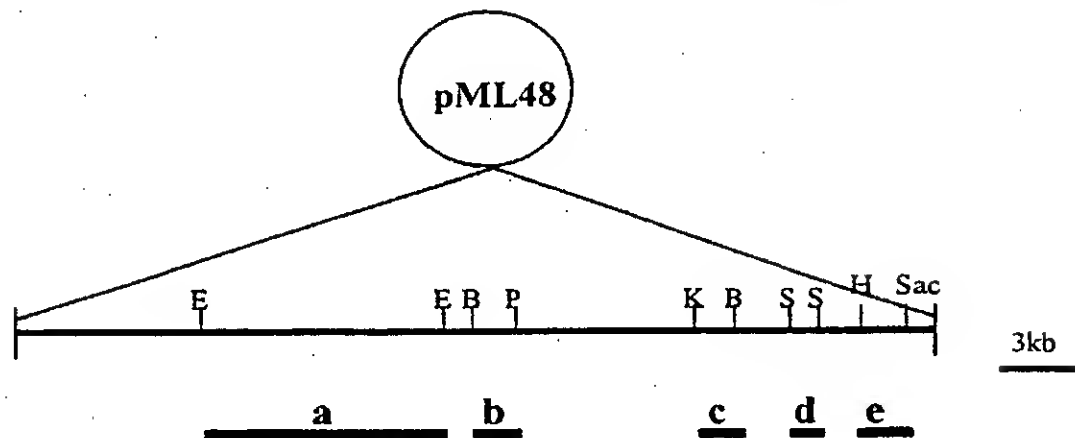




3/3

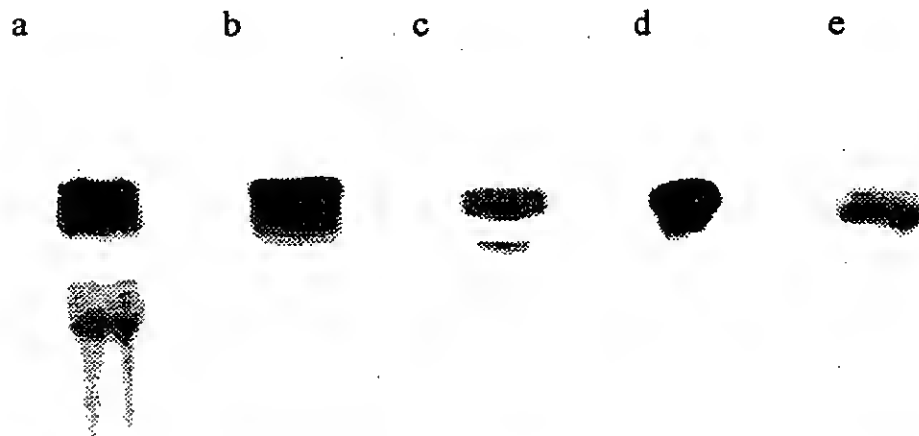
## 【図3】

A ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションに使用したプローブ (a,b,c,d,e) の位置



E, EcoRI, B, BamHI, P, PstI, K, KpnI, S, Sall, H, HindIII, Sac, SacI

B ノーザンブロットハイブリダイゼーションの結果





## SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company, Limited

<120> DNAs related the biosynthesis of ML-236B

<130> 2000103SW

<140>

<141>

<150> JP HEI 11-227696

<151> 1999-8-11

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 1

gatcaatact acgtcgttgt tatttccttg tcagtaatga ctaacaaatt cccagaaca 60  
gacgaagtca cagctcacac cacaagagaa aatgagtcca gcgaggatta cagatttctc 120  
gccaggcaaa ccgagaaaag ctctcttatg catccacggt gccgggtgct cagcagccat 180  
attccgcgtc cagatctcta aactgcgcgt ggcgttgaaa aacgagtttg aattcgtata 240  
tgcgaccgcg ccgttttagct ccagccccgg acccggcgtg cttcctgtct tccaaggcat 300

gggtccatac tacacctggt tccaaaagca tcatgacgcc gttacaaaca cgacaacccc 360  
cacggctgggc gatagagtag cggctgtgat cgggcctgtg caaaagaccg tccaagattg 420  
gtctataact aaccacagg caccattgt cggcatagtgc gccttctctg agggcgcat 480  
ggtcgccact ttgctgctcc atcaacagca aatgggaaaa ctgccatggt ttccgaaaat 540  
gagcattgct gttttgattt gctgtttcta tagcgatgaa gccagagatt acatgagagc 600  
cgaggcgcaa gacgacgacg acaagctaataatcaacgtg ccgacactgc atcttcacgg 660  
tcgtcaagat tttgctctcc aagggtcgag acagatgggt gaaacacatt acctgcctca 720  
gaatgcagat gtactcgagt ttcagggaaa gcataatttt cccaacagac cgagtgatgt 780  
ccaggagacg gtcaagcgt tccaacagct atatcaaaag gtcaagatgt caggttcatt 840  
tgtctaggtg agacaacagg gtatatagca aggctctggc tctcatgcct agtcataacc 900  
acatttttac tgaacaaatt tgaatagttc taatcttaca cggtttgaat gctcaccttc 960  
caagggtgat ttagttatag tggtcgcgac catctcataa atatttcgtg aacatatttt 1020  
ggatagatca tggaaggctc gttctgaaca ggcatgacag acatctaaaa cactcgatc 1080  
accacaacaa ggcactaaac cagtaactat ggaactattt gcaatggcgt cgaatttata 1140  
tacaggatgg attgaaatca attccaagcc ttggagggtt caccttcctc acagagtctt 1200  
tcgaaacgcg ctaccgaggt atatttatca ccgttacgggt actctgaacc gcgctatcta 1260  
acttgatgtt acgattgctg caataaagaa gagcaacgaa ggtagaagta attttgacaa 1320  
agatacaaga cgaattcgct atttgtagat gaatatgcgt gtgtcaattg acgccgaatt 1380  
caggatagat ttgccatctg ctctattgcc aatttctaataatccatctttat catgaacaac 1440  
actcaaacca cacatctgaa ttcacggcgc tgaacgatct aggccaactt cagagccggg 1500  
ttcatcgaga acatagttag gattgaagaa aagtggctta caaaggcctg agcgtgctca 1560  
gggccatata gcgagctctg aagtttgaca tgaatgagtg ggtccttgggt agggatcatc 1620  
cacatctcga gaacgatgtc ataaggagtg cgtcacggg aagcgagaac actcgtcatt 1680  
ttggcattgc caattgagcc actctccgct tgaccctgct tgtaatcaaa gacagcctgg 1740  
aacaaggggg cgtgtgtctg agtcttgggt tctcgcctg aggtaggag attcaggcct 1800  
agacagtcca ggatgacgcc atacggcacc cgcgcgtgtt gcatggcctc acgcacactg 1860  
tccttgggtg ctacaagggtg ctgcgcgaat gtcttgctgc cgacgaactc atcaaagcgc 1920  
aggggaagca cgttagcgaa aaagcccatc gccgaaattt ctccatggt ggatcggttg 1980  
gtttcggcga ggccgatggt tatgtctttg ctgccggtaa gacgcgcaa caaacgtgg 2040

taggcggcca ggtagaactg catgggggtt gccttgtgct tgcggctccg ctctttgatt 2100  
cggaaggcga ccatgggacg taaacgagca attgcttcat actgctgccg cgtgaatggc 2160  
tgtatttgcg gctgctctga attggcagca gggtcattga tcagattcat gatgggaagc 2220  
acggttggcg cagatgacga gactttgcta tgcattggact tccagaacgc gatatcgctc 2280  
cccattcgcc cattttccag gttttccgcg tgttggacgg ctagatcaga gaattgggtc 2340  
gatggtcgct gcattttcac cccgctgtaa atctgccga tctcattgaa caggttttct 2400  
gttgttgagc catcaccaac taatctgtgg tagccgatta ccaacagggtg gtcattctgtg 2460  
ccccagtaga aatcaacgag tctgagagtg tcacctgtgg agatgctata gtttgtcttc 2520  
tcgagtttcc ggtactcttc ctctgcctcc gcagcgttgt tcacctgaac aaagtgcact 2580  
ctgttctccg ggttcttgag aaccacttgg acgggacat ttaaactcgt gctatagtca 2640  
tcgccagtaa caaagcacgt acggaagatc tctgacggc gcaatgaggc ttcagagcc 2700  
cgctcaacc ggtcgaggtc aatggtaccc ttcattgaaca tgccaatagt gttgttgaag 2760  
atggtatgat cttttaccat ttgttgctgc ctccaggaat actcctggcc aagggaac 2820  
ctctcgac gaagaatctt acggcctccc tgcctattat cgtcctcttg ctcttcaccc 2880  
tcttcggctg acgacgac tgtgctggta gcagagcttg ctccatcatg gctgtctgtt 2940  
gggtgcggag aagccccgt gtccgagggt cccgtggaat caccaattg caacagcagc 3000  
ggaatggatg tagctgggag tgggtggcc gcgtcgtcgg caagatcagc gacagaagca 3060  
ccgccaagta cctcaagag tgggaggta aggtagagtt gctttgagaa ccatgagccg 3120  
acagtcactg cacccaagga gtcacacct tgatcaatga gaggaatggt tgggtccacg 3180  
ctctccccgt ccgaaacttg gagggtaaca cggagtctt cagatagacc atctgcaact 3240  
ttgttagttt gaactcgata tcaggaaacg catgagagat aacttacaa tcacgatttg 3300  
ccgaaacttg tctaaagtgt ttgcttggtt gagctggctg gcaatggagc ctttagaccc 3360  
tgatccattg tcgccaccgt ctccgcgttg accgggaatt ttgaagtct cgaacgagg 3420  
gtcgttgaag taaataattc gatcttgaag cgcagggtca agatctggga taccctggt 3480  
aagctcaagg tccgccatgt caatgaccgt cttgcgtgt ggttgctgcc gggcacgctg 3540  
gtcagacacg accgcttcgg cgaaaagcgt gtgcagctca tgccttcaa ctgagtcaa 3600  
catgaaacgg atagcatcaa agtctctc catctcgcc ctctgacaa accctacacc 3660  
gtaaacggca ccaatatcga tggttgatcc ctgtggtgt gcgttagtaa cttgacgtcg 3720  
atgcatgata attcaggggt agaaaatacc gccaatctc tggcgaccg ttgtgggcc 3780

agagcctgta ggtaggcatt cgcagcgcca tagttggact ggccaggatt gccataact 3840  
gcaacaatgg acgaaaacat gatgaagaag tcgagcgcc tgcctgccgt ctgttcggag 3900  
aaccggttcat gaagaatgcg tgctccttgt accttgggt tcaacacat gtccatcatc 3960  
tggttggtcca tgttcttcag catgacatcc tgcagcacca aaggcccgaa cgcgatgccg 4020  
gcaacagggtg gcaacttcat atcgacaagc ttgccaaaggc cagcatcgac tgaatcctca 4080  
ttggcaacat ccctaaagaa agtaattgga taagtaaagc aggatgtggt agcaagggtg 4140  
gatgtgatat caatcaactt acattgacag aacggtgatg tcaccaccaa gtgcctccat 4200  
gttggcgatc catttgggat caagtcgagg gttccggcta gtgagcacia catggcgggc 4260  
gccatgcaag atcatccagc gacagagaga gcgaccaagg tccccggtaa gaccaacaag 4320  
caaatacgtc ttcttgttgg aaaataagtt accagagtcg atggggcaaa tcttagcgga 4380  
cacctcattt tccttccagt cgatgacggt ggccagattg aagcgttggt cattgtggtt 4440  
gacagagagc tgaccaggca agagaatttg tgtggctgta ataactttct cagtgtcgtc 4500  
gacagtcgac gcagagacgg tatTTTTTgc cattgccaca gagtgtcga ggattggaat 4560  
atctcaaca tgactaactt tgtatgtgga agctgtactt cggataagat agtcaccact 4620  
gtacatgaag caactgggtg gtagcaactt ggccaaacgg ttggttatcc cggcagcagt 4680  
ccggtcggta gacaagtcaa agaatgccat catgtttgtc ggcaggctgt gtttcagccg 4740  
agcgtcgggt tccttggcat gtaatcggat ccaaggagcc ggaatagttt tgacgtcgga 4800  
cagagttgtt gccaaatgaa cctgaacacc gtaggttttg gccgactcca gaattgcttt 4860  
gacgcagaag attgggggct ccataatcag aattgatgca tcagagccaa aggactgagc 4920  
gctagagaga attgtttcgg caaggagggc tgcagctgtg gacaacaaga aggaactatc 4980  
ctgccttcc gccatgttat cgggcagact atgcatgtag tttctcggt catgcagtat 5040  
agatccattc ttctcagcca gggcgactac aggcacctca catgtattct ccagaatact 5100  
gccctgcacg acatggaagt atccgagatg gccacgcga attgcctggg gaagagcgta 5160  
gcgaacacga acagttgctt ttccagcatg acgagcgtct tctaacgaat cacacgtctc 5220  
ggttgactca agatagtaca tcgatgagga tgctccctc gcctctttca gtgcaatggc 5280  
cgtcttgac gaattaaagt taccgaaaat tggacgacga gacgagttca tacggctggt 5340  
cctagcaata tctgtctca aacgagggac ccaggcacga ccttgcacc agtacacttc 5400  
gggctcatga gtccatgtta ttgattccaa aagctgatca tcgctctct cgaagcgcaa 5460  
aagttgctca acgaagaatt tgggtgtctag gttctccaca gtatcgacat cgaagacgtg 5520



cggtcccaag tcagggttct cgagcttgat tgctctcaac attccgatgg tgctggcctg 5580  
gtggggatga tcaatccagg cattctctgt cagccacatc atgcgtccgg cgtagaagag 5640  
aagagacttg actgcctcaa acttgctctc ttcaagggtg caaacactt catcatcaag 5700  
ttccgagagg atgacaaaag tcgacttagg ctgcaaggcc gggtcgtcga gaacactttc 5760  
cagccgcttg acggagtga tgtgtctatg cggtagggca gctttcatgt cgttcaaaat 5820  
gcgttcgggtt tttgtcgatt cgccaccgat aaccactaat ggcggggtatg agtccttcaa 5880  
tggagcagaa agtggatcat acaaacgctc aacgggtggca tccacagcat gtgtactgaa 5940  
gacagacggg atcaaatcat cctctcgatc aagtgtccga ctatcgacgc cagagaaacc 6000  
aactctcttg agggatgct cccattggtc aacggacccc gaggcactca aagcacgagt 6060  
ttcgtcttct ccagtcctc gatcagcgaa aagcccagag atgaaggcga ggcgagcagg 6120  
ctcgcgatgg gtgaccccg aagtaaccaa gtgaccaccc ggcttgagca aggaccttat 6180  
gtgagccaat ttttctcga agttggagct ggcatggagg acatcggatg caataatcag 6240  
atcgtaggag tgaggcttga atccttgctc tgctgggctt ctgttgatgt ctagtgcctc 6300  
aaactgcatg agaccgtcga attcggaag ttgttcacgg gccttgccaa taacatccgc 6360  
cgagatgtca gtgcaagtgt aactgttgaa accaagttga ggtgatgcaa gaacgcgctt 6420  
cgtggcgatg cctgtacca agcctaaaaa gccaacgaca gattagcaaa ctgcctagtt 6480  
acttacattt cagattcgac ttaccgatct caaggatctc aatggattgg tagcgatgag 6540  
caatttggtt aaccagatcc tgaacgacgt gtattgctga gccaaaggcg agcttggttg 6600  
tatagtactc ggtgaacaac ccctcgggtt tcatgatctc caaaggatcc ccgttcccgc 6660  
gaacaattga aattaattct ttgcctaccc tttggatcag gcgcacatgt gggtgggacg 6720  
agttgcttca agtaaaagg taatataaaa gaatgaaaaa acacggaaca gctttgggtg 6780  
tacctttcac acatttgctc aatgtgaaca gaagtgtcct cctcccaaga ctcttggtac 6840  
cactgatggg ggccagcccg agcatcgcc tgaacctggt cacaccattc aatgtacttc 6900  
tggaatgga ggtcggcatt ttgacggtcg tcgggggtta tctgggctag gaaggatttg 6960  
atgtagaagt aaacgattcg ctgatggtc agaatgtcct ccttgctccg agctatgac 7020  
aacgtcgcag ggtcctccag cagtttttcg ggcgtagggg gtcccagac ccactttgcg 7080  
aagattcggg ggtcggtcga agcagtcggg ggagagaaag gcttaaagac aatgttatca 7140  
acttgaaaa gcgttgctt ggtcgaatcg tacaccgtga tgcgcgcgt caggaaatca 7200  
cccttgctgt gtgtgttgat tgtgtcaaac gcaagctcgg tttcaccaga attaccgcc 7260

gatatacaga gcgatggaat cagagtcact ctgtcaacgt gagtaggcac gtacaatgag 7320  
cgtagggcag gatctcctgg agaggaatac gctccaatga cagtctggaa cgcgatgtcc 7380  
aggggcgctg ggtggagcaa gaggggctca ttgcgcaatt catccttaag tggaaggaaa 7440  
gccaaaggtgc cgctagcttt ggagtcggcc ctctcatgg tctgcaaacg acggaagtct 7500  
ttgctgtagt catacccaag gaggtcaagt tcccgataga agaaatcgat gttgacattg 7560  
ttcatctggg ggtactcttc ctccaggtggc ggcaaaagct gcgatgacgg tgatgcctcg 7620  
ccaagggta tgacgatttg gcctttggcg gatgtcgaaa gctcactctc ctttgccaga 7680  
caggaatcaa taacaaattt gaccgtgact tggccatccg catcattgtc actggtgact 7740  
tcggctgtca agttcagctc cacggaggtg ttttcatctt caaacacgat ggctttgttg 7800  
atgctcatgt ccaagatttc caggagctga acttgggcgg cagctcacc agccaccttc 7860  
atggcagctt ccatggccat aattatgtac ccagcagcgg ggaacacagt ctggccttgt 7920  
agcgcatgac cgtcgagcca ttccagatcc cggggcctga tgaagtttgt ccactggaag 7980  
gtcgatgctg tgctgtaaga agaaagcttt ccaagcagaa gatggggcgc acctccacga 8040  
agatgctggc ggggtggagcg agattctgcc cagtattgac gagtatgac ccaagagtat 8100  
gtgggcaatg actttgacag gttttgaacg gcacgatcgg gccggacttg ttgtacgaag 8160  
ccctcggcgt cgatactccg aactccgaaa cgctcccaaa tgtatccag acctccagca 8220  
aaagcgteca catcgtcaac gtttcgtgcc aagcaccgg tatacggcag ctccacaccg 8280  
gcaagagcat ccttgatggt ggctagacac ggacccttga gagcaggggt ggccccaatt 8340  
tcgatggcga cgtcgattag acgatgagt atgactgctt tctgcacagc ctgcgagaac 8400  
aagaccggag agacgagatt gtctttccaa taagcgggca tcacatcctg tacagtcatt 8460  
tgcttgctgg tctcgtggac ggcagagaac caagcaacac tctcgttacc ttggccatcg 8520  
gcaacagcac agtcgcactc cagcaatgcc ttgacatatg gagctgcga tgggtgcatg 8580  
tgatgcgaat ggtaggcctt gtcaactctc aagattctgg caaaagtga ttcatcctcc 8640  
aagacacctt caacgtgctg gatagcatcc atgtcgccgg agaaggtcac actatccggt 8700  
gaattgctag cggcgacgca gaccgaccc tcaaaggctt cgagctgca tagttccttt 8760  
gcgtcatcgt acgacatacc tgccgctagc atagcgctg tctggccgct tggagaagag 8820  
gcatgctccg cggacacaac tccacgcaga tgcgcaatac ggatagcttg agtggcactg 8880  
atgaatcctg ccgcaaaggc acaggcaatc tcacctgaac tgtggccgac aattgcaactg 8940  
aactcgatac cagctgcagc gagaagtcgg accagaacga tttgtacggc gcagcataga 9000

ggctgggaga agctggcgag tctgacgttt gaggcattccc ctccaagcat gagctggta 9060  
tacagtgtcc acgtaggccg atacttttca ggcagtgttt gcagtgaatt atccagctct 9120  
tcgagaatgc ctctcacaaa tggcataccc accatgagct tcttcagcat gcccgccac 9180  
tgtgcacctt ggccagtaaa gacacctagt acgcgagggt tgctattcgc gtcgggtcgg 9240  
aagtcggatga cgacctcacc gtccgcgatg gcagcctcca gtgccgcgcg ggctacttcc 9300  
ttgttgtgtg ctgcaatgc acgacggaag ggcaagatag accgtttctc aagtaaggta 9360  
tatgcgatat catgcatgtc cagtcatca tgcgtttcca gaaattggag catattttct 9420  
agcgttgctt tcatggagcg ctgcgacttc gatgaaagca caaggggcaa gctgcatgca 9480  
tctgcatctg aggtcacctc tgttaccact gctgtcggct tgtgtggagg agccatatac 9540  
tcttcgataa tagcatgggc atttgtacca ccaaatcctg atgtgtttat atgttttagct 9600  
aacttcactt tcgttctcaa gaagtgcagt tgaatcctta ccaaatgaat taacgctgac 9660  
tctgcgaggc tgcccgggcg caacaatcgg ccattctgtg gcctccgttg caattttcaa 9720  
gtgcgtatag aacggagcga cagggggact gatcttttca aacagcaggt ttggcgggat 9780  
cacgccattt cgtacagcaa acgatgcctt cattaagccc gcaataccag cagtgccttc 9840  
cgtgtgaccg agaactgtct tgatgtgcc gacaaaaagc tcatttttct cgccgtcgt 9900  
gtcgattgtt ccactcctgt gtccgaagaa ggctgttgca atagcctcag ctccctgtgg 9960  
gtcaccggtt ggtgtaccag ttctgggat cttegtgtta gggagagaga gactttctgc 10020  
aacttcata aggtgatac ttccaggga taccattac catgggttc aaagaactgg 10080  
cagcgttctt gggggtttgt aatatcaaga ccagccttgg catatgtggc ccgaatgagg 10140  
gcttcttgtg cgctatggtt tggcattgtg atacctgtcg ttcggccatc ttggttgata 10200  
ccggtctctc ggataacaca ctgatactg tcccgtcgc gcagtgcctg gtcagcgtt 10260  
ttcaggacaa tagagcaaac accttctaa aaagcagtta caggaggtca gtgccatctt 10320  
gctttttttg aaaggaattg atgcattgtc aacttactcc tctggcatat ccacggcag 10380  
cagcatccca cattcgagat ctaccattgg gggacagcat gttcaatttg ctctccatta 10440  
caaaggatcat ggggccaat atcagattcg caccggctgc aaccgcatg gtactctcgc 10500  
ccgttctaag ctgttgacg gccagatgca cggcagctaa ggatgaacta caggctgtgt 10560  
cgatcgtcat ctgcagaatc agtcaggaat ctgtcagcac ttgacgaagt cgggtcgt 10620  
caatgagtgg cactcacact cggcccatgc cagtcgaaga agtatgatac acggttgag 10680  
gccacactga cagctacccc cgtggcagag tatgtaggaa tactatccaa ttcacgcgtc 10740

acgatagtct catagtcatg cgtcatcata ccgacgtaca cagcagtaga ggatccttga 10800  
aggccttggga tccgtaggcc tgcgttggat acagcttcat agaccgtctc cagcagcage 10860  
ctttgctgtg ggtcaatcgt ttccggcctct ccagcttggga tgttgaagaa agaggcatca 10920  
aaaccgcgta gatcctcctg cagcaagtat gcaaaggggtg cgttcgtgcg cccgggggtga 10980  
gtgccatcgg ggctgtaaaa tgtatcgacg tcaaatctct ccttagggat cttgggtctgt 11040  
acatcccggg gctctttgag cagctcccaa agttttgatg gtgtgttgac accacctgga 11100  
aaccgacaac cgcttccac taccacaatt ggctcgtttg gatagttggc ttgatccata 11160  
actgctgate ctgtttttgg gcgataggat tgggat taaa ccttgtcttg cgtcagtaga 11220  
tcttctact gcatgccggg cacaacattt gttcttacag aatcgagag ttgaatctct 11280  
gagcgaacaa gccggccttg caaccgatac cgctcgttata ttacttgca cgtatcagta 11340  
ctcatctaga ttccggacaat ttcaagatec attctagtag tcaaatgcc ccacttccca 11400  
gcaatgcaag ctccggcact agcaaaccct cccggcgta ttcgggtgcac gaatagccat 11460  
tctccatac ggcgttatc ggtcacacga ggctgaatga atcaaactg aatacaatt 11520  
ggctgtatca aggtgaaacc gagtttttca ctccgattgt tcttgtctg ctccggtgaag 11580  
ctgctcctaa aggaaacaac cgaactgcc catccagga aacttcgatt gggggggggg 11640  
ttttttttt ttcaagggtg actggaagag tgctctcggc caaaaatcc cagaagcatt 11700  
agtgtgttta ttccgattata aaccgtcgca gcgtctcat tcttcgtct tcttctttt 11760  
ccactgggtg gcatagggtc tatctgtctc acgcaatgct cggccagggt cttctgaccg 11820  
tcgaatcgta ccaatgggta tcgacccctc aagcccttgt ggccggtcgca gtgttctta 11880  
gtctcatcgc ctaccgtttg cggggggcgc agtcgaact gcaagtctat aatcccaaaa 11940  
aatgggtggga gttgacgacc atgagggtta ggcaggactt cgatacgtat ggtccgagct 12000  
ggatcgaagc ttggttctcg aaaaacgaca agccctgcg cttcattgtt gattccggct 12060  
attgcaccat cctcccatcg tccatggccg acgagtttcg gaaaatcaaa gatattgtgca 12120  
tgtacaagtt tttggcggat gtatgacctc tgaattttcc attgttgtaa ctcaatgacg 12180  
tctctaagat tctgatgaat gtataggact ttactctca tctccctgga ttccgagggt 12240  
tcaaggaaat ctgccaggat gcacatcttg tcaacaaagt tgttttgaac cagttacaaa 12300  
cccaagcccc caagtacaca aagccattgg ctaccttggc cgacgtact attgccaaagt 12360  
tgttcggtaa aagcgagggt aagtgtcaat tttctgtct tgagcattga gcctctggct 12420  
gacataccgc gaatatacta gagtggcaaa ccgcacctgt ctattccaat ggattggacc 12480

ttgtcacacg aacagtcaca ctcatatagg tcggcgacaa aatctgccac aatgaggagt 12540  
ggctggatat tgcaaagaac catgccgtga gtgtggcggg acaagctcgc caacttcgcg 12600  
tatggcccat gctactgcga ccgctcgcct actggtttca accgcaagga cgcaaattgc 12660  
gtgaccaagt gcgcgcgcga cgaaagatca ttgatcctga gattcagcga cgacgtgctg 12720  
aaaaggccgc atgtgttagcg aaggcgctgc agccgcccc a gtacgtcgat accatgcaat 12780  
ggtttgaaga caccgcccgc ggccgctggg acgatgtggc ggggtgctcag ctcgctatgg 12840  
atttcgccgg catctacgcc tcgacggatc ttttcgtcgg tgcccttggtg gacattgcc a 12900  
ggcaccacga ccttattcag cctctccgcc aagagatccg cactgtaatc ggagaagggg 12960  
gctggacgcc tgccctctc tg ttcaagctga agctcctcga cagctgcatg aaagagacgc 13020  
agcgaatcaa gccggctcgag tgcgccacta tgcgcagtac cgctctcaga gacatcactc 13080  
tatccaatgg cctcttcatt cccaagggcg agttggccgc tgtggctgca gaccgcatga 13140  
acaaccctga tgtgtgggaa aaccccgaaa attatgatcc ctaccgattt atgcgcatgc 13200  
gcgaggatcc agacaaggcc ttcaccgctc aattggagaa taccaacggt gatcacatcg 13260  
gcttcggctg gaaccacgc gcttgtcccg ggccggttctt cgccctcgaag gaaatcaaga 13320  
ttctcctcgc tcatatactg attcagtatg atgtgaagcc tgtaccagga gacgatgaca 13380  
aatactaccg tcacgctttt agcgttcgta tgcattccaa cacaagctc atggtacgcc 13440  
ggcgcaacga ggacatcccc ctccctcatg accggtgcta agatataaca cgcaactaa 13500  
aacaatatg catccgtccc caggcttatt ccaatagttt ccgtcccaga gaaactaggt 13560  
gctgtattag tcgagtaggt tagtaaaata aaacgcattt tattcgattg tgatgccttc 13620  
tttgtaatcg aacgtggtgt agactttggc tatgtgcgag agacagaaac acagagagag 13680  
agaagggaga gagtgtgtat tctgtctacg cagagcgccc atctgcttct ataccgccag 13740  
ctacaccgcc acgtagggaa gtcggcagta atgaagctt tctcccggt acaatcaccga 13800  
tctccccatt ctctcaggcg ttgactggcg cttacgatga cgagggtta ggctctgtta 13860  
agtcttgatg ttctactca acatccccga ctaggcgaaa gagaggacgg cgcaacgacg 13920  
tggaacaaag tactccctcc cgccctccga ctacatatcc acaatctgta cccactgccc 13980  
gtgccaacgc ctttcgaccg ttcaacgcgc atttacaagg cttgcgggaa tcataatgga 14040  
gagaaaaaga gagaactttt gacagtcaag cctccgaggt gctaagacag cttccctggt 14100  
agtataaaaa gcattcactc ttccgacttc gagaacgagt gcacatgtgt actttgttgc 14160  
ttctcagggc cactgtaatg gtatttcagg tatctctatt tactgctatc cagaagtcag 14220

gcattaaata gtcaggctca gccaggctc gattcagatt ggattcaggc ttcagaccat 14280  
ggccgctatg ctccctcgta ctatacctcc gtcgagctat acccgcttgg ccagacaaaa 14340  
ggcttcaactg aacccttcaa ctttaactgca ttctgccaca actaactcga cgaggccggc 14400  
gatgggtgta ccattcatga gctcaaagat cgacacatca acatggattt cagatgtgat 14460  
ccagtttcga agttcaatgg cgacgagtga gtctacgccg acacctgcca ggtttttgga 14520  
cgaggacatg tcgtcttctg ccagaccaaa cattcgcatc agcttttccg tcattgcttt 14580  
gaggacgata gaaatggcct cgtcgtgaga ggtgacctg cttagttggg ccgcacgcc 14640  
atctggctct tttttatgcg aagagacaaa ggattggtct gcatgaagga cttggcggtg 14700  
tttaagtccc acaaaccgct gttcctgtat ccagtttgcc tcgggtccagt gagcaccgg 14760  
ggatgtgttg attcctgtaa ccacagctgc gggagggtgat ggaaattgag gggaagaaca 14820  
caggattgcc ttctccaaca catccatgac gtccctttca tgcataagct tgtaacctat 14880  
tctagcgagc cggtcggcca caccacggcc agtttcagcc acgtatccaa cagacttgac 14940  
catgccaag tcaatggtga cagccggcat gccatgggct ctccggtggt gcgcaagtgc 15000  
gtcctggaat gcaccagcag ctgcgtaatt ggcttggcct gcccaccca tgacccaac 15060  
aagggatgag agcatcacga agaagtcaac atcctgtgcg atcttgtgaa gataccaact 15120  
acctgtact tttggcggtg ttgctgcatt aaattcatcc aatgtcattc gcgatagaag 15180  
cgcgctcttg agaaccatgg caccttgat gataacctga attggcggtg catgtgcttc 15240  
ttgcacaac cggagcacct tggtagctg atcttgatct gagatgtcac atgctgtag 15300  
atagacagcg cactgttgat tttgcaagct gggttatgaat ggactggcct ttgcacttct 15360  
cgataggata atcaagtgtc tcgcgccatg atcaacaagc cactgacaga tctgctttcc 15420  
aattcccccc agcccaccag caactaggta agaactgtca ggcttcagct tcagcgagaa 15480  
ccctccatcg ccgactggga ccagttcgtc ccagataca ttgaccacaa ctttgccaac 15540  
atgtgacca ctctgcatc tacggaagc cttctcgatg tttgacaagg agtgtgctg 15600  
gattggacca atcaagcaa tcgcttttgt ctcgaggagt tttgtgacat ggttcaacgc 15660  
ttcgatact tcttcacttt tggctctttg ccacgagaga agatcaattg atgtgaaaga 15720  
gacgtcccg gtgaatggca gcatgtcaag tctgtgttt tgctccaggt cttttttcc 15780  
aatctcaaca aatctgccga attcggccat gcagtcaaag cttgcttgga ggagttgacc 15840  
tgccaatgag tttagaacga catgaacgcc aagtcgccc gtgtaggctt tgatgccgtc 15900  
gacgaataag tcattcctgc tcgagaagat atgatccgga ttgatgccga atttatcgcc 15960

gacaaagtca cgtttggctt gagttcccgc tgtgacgaag acctcggcac ccgcaagctg 16020  
ggacaaaatg atcgttgctt gaccgacgcc tccagctcca ctgtggatca agactctttc 16080  
gcctcgtcgt agctttgccg tggataaaag cgcaatatat gcggtagtga aagccagggg 16140  
gaccgaagcg gcttctggga agcccatttc gtccggaata cggacgacat tagtgtacgg 16200  
cgtctgtgtt ctggtcgccc aatggccttt cagtagtgca catacgggt cccctaattc 16260  
gaggccttgg ctacggcag cagctccacc gagctttgtg atcactccgg cgcattcgaa 16320  
gcccatcaca cggttggcct ccaattgacc catggcaacc atgacatccc gaaaattgag 16380  
accgaaagct ttgggttcga tttctacca atcatccga agatccttgc cttcacgtcc 16440  
ttcgtcgtct cgaaattgca gggagtctaa gagccctggc gtctcaacct ccacccgag 16500  
acgacgcccg ggttgctcga acggctgcag tgtgacctca accgcttctt ggtccttcca 16560  
gtgcgggtca ttgaaaagtc gcggtacgtg gatgacgccg tttctctctg caaattcaaa 16620  
ctccttgtct tcggaaaggt cggcgaggcg gccattgaag atattgcaga tagcatacag 16680  
ggactcgtgg gtgtatgctt ttcgagaagg atcgagatcc aacgatacat attccttccc 16740  
gttattttcg ttgcggatgg tacgcagcag accaatatgt agagctttcc atggatcctc 16800  
ggagctcatg gctgtcctc tagacacca gagaagtgcg ttgcagttat tcagcatcgc 16860  
ggtgatggat ttgaaggctt cgttcccac ctctccaagg agcgaggact ccatttcccc 16920  
aagaaaaatg catgtccttc cagtggatc tacctcgccc agagcgttga tcgatgggct 16980  
agaactggtc ttttcacaaa ttgtgcctg gagactttcc agccaagatg aaggaggtcg 17040  
gagcgtccg tgcagcaaaa gcacctcga ttctgccact gtatccgggg ttgtattctc 17100  
ttttctagcc gtcgatagca ttgtgtgat catgtaaaac tcacgtctt cacaatcacg 17160  
aacctccaat tccacaccgt tgaaaccgt cgtgtccaac atggtgttcc aaagatcgg 17220  
agtgagcgat ggctgcact tccgtcagg ctctcactg agccaccaac ctggcaacag 17280  
tecgaaggta aagaacaaat cgagctgac cctggtagtc tcaacaaaa tcaagttgcc 17340  
cccaggcttg agcaattttc gaacgttact cagtgtcgt ttcatgcac gagttgcatg 17400  
caggacctgg caagccacga ccacatcgta ggtggcacat tcaaaccctt gttgctcggg 17460  
atcgttttca atatccaatt ttttgaaagt catcacgtct tgccaatccg caaattgctc 17520  
acgcgccgac tcgaaaaacc cggcagacac atcggatgaag tcataacgat cgateggctt 17580  
ggtgtttccc aatgcattga caataagctt tgtgcagccg cccgtgcctc cgccaatctc 17640  
caaatgca gaacgcgggt tcttgtgggc gaaagtccg atcagctcgc tggcttgtgc 17700

gtttgatcgg ctccatttga ttgcgttgac gtagtatctg cttagcagct gatcttgcac 17760  
catcaactca agtggctctg ttctcgggcg tagcattgct attaaactgag gtcctagacg 17820  
agaaatcacc tcgccattga cgctttctcc agcgactctg gcctgtaggc atttcttctg 17880  
ctcagcatcg tcacttagcc agtcgcaact ggctgggctg agcttgtttt gtctcgcaag 17940  
gtccaattgg acattcatcc aatcgaaata cttctgaagg tggccatcca gatgttggat 18000  
atcagaattt gtcaaatcag tgacagcctc ctgtataaag ttgatcgtgc atcttcggag 18060  
gtccatcatg agttccgttt cttctgtctc agcctcagtg ctcaactttt ctttgagcca 18120  
agtggagtca cccaagctga tgtcaggggc ccaaaccag gagctgcagg cattttctgt 18180  
gtcgttggag tctgactttt ggctcagagaa gctgcttcca accgactgga aaacaaggcc 18240  
ttcaatctct atgactggga ttccgtccga gggagaagaa ccgctatcat agtcatcaa 18300  
cactgccaaag tcggtagaga aggattgaga gttgcgatcc ttgatgctgg cctgtgcgtc 18360  
cagagcatca ccagcctcca agtcagccag gctagaggat atttgacat ttcttagcct 18420  
ccttggtacc atggccgttt tcatacgtgt tcccgcgtag ggtaacaccg tgtatgccgc 18480  
ctggatcacc gagtccagag tagtaggatg gacgatgtgt cgattctcgt acgagtgagg 18540  
catagccgag gcagtgtcag caatggaaaa tctgcaaac gagccctgtc cattgttttg 18600  
aattcgtga atgttctgaa aaatgggtcc gtggcatatc ccattcgcgt gtaaggactc 18660  
ccagagateg ttgggatcaa tgctccggtt atctgagcct agattcaacc tgcgtgaggc 18720  
ttccacagtt gaacagtcaa ggtggcttct ttctctctcc gaacgtatta atccggtgca 18780  
gtgttctgtc caggtattat ttctgcccga aattgagtgc acagaaaatt gatgccagtt 18840  
ctttgtgccg agggaccttt cctcacatga acggatcgtt aggcgcaggc caacctctgc 18900  
ttctgcatca ggggttatta tgagagcctg cgcgagttca acgtcacgca agttgtagtt 18960  
gatgctagcc cccgcaactg gtgggcagac ttgtgaaaac cctcgatgg ccatgctgat 19020  
gaagccagct cccggaaga tgatgctga accaacgacg tgatctcgta tccatggaat 19080  
atctgacaga cggagaacat gtttccattt aggcgcgaaa tgaggagaga gagattcccg 19140  
tgagcctatc aaagtgtgag gcggatgggt tctctgtttg gactcacgac tgccgcgagg 19200  
ctctctccaa taacgggttt ggtgattcca cgggtacgcc ggcaaatgc tcagtacctt 19260  
cactctgggc tcttttcttc catgaggaaa gtttatagcg tccattttga gcccataacc 19320  
cttgettate aactccgtag cagcacgata cattgtctcc aacgagcttc tgccgcgaga 19380  
aaggcaactg agatagtta tatctgttcc ttccagacce agatcctgca tgacttggtt 19440



gattggacca ccaagcgctc cgtgaggccc tatttcaata atcacatcga cggttttctc 19500  
tttgggtgttg ggatcaaagc acatctcgcg gagtgaggac tcgaactcta ccggctgtag 19560  
catactatcc atccagtgtg tgggatccaa tagcaattta agatcgggtca tgcgactacc 19620  
agtcttaggt gatgaatata atacaccctt tgagggtgtca gcattgggat tgtcgttggt 19680  
gttatccgag ttgaacagat ctctcagtga cgccccaaag gcattctgcc ttgggtcgcat 19740  
gtggcttgaa tggaaggctt cagtgaacttt cagtttctctg gtaaagatgc catcggcggtg 19800  
taacaacttt tcaagtttct cgattgcacc caaatctccc gacaccgtca cactacattg 19860  
actgttgata catccaacca ccacacagcc gtcctcctgg ttgagacgag aaatgtaaac 19920  
attgggtctca ctgcgaccaa gaccacccgc catcattcct cctttggctg ccaatgcggg 19980  
cttgggctta gtggtcaata caccgcgtat ataagtgatc ccaatggccg accgcgcgga 20040  
taaagcccca gctgcgtagg cagcagcagc ctctccactt gagtgaactg ttatccccgt 20100  
tggccgaatt ccccatgacc aaaggagacg cacaagtga atttggatag cggttgacag 20160  
tggtgactg tattcgcat catttaaccg agtcgtcagc tcatcacggt ggagctcctc 20220  
tgtgcaattg aatgttagta cctcaagctt gatacagtat tacttttccc gggctcgcaa 20280  
cttaccata aaattccaac tcgcgccag ttgcttgatg tagccatcac attcaagaat 20340  
cgctgtttg aatactggga atgtattgac cagctctctg ccattgcat gccactgcgc 20400  
cccctgaccg gtgaatacaa atccgagccg tacttttctc ttcgtcgtt ttggttgatt 20460  
ggactcatcg ctgagggcag aaacaaggcc gccaaaggctg tctgtacat aactgacgt 20520  
ccatggcaga atggaacggc gagagcctag tgtataggcg aggctggcga ggaagggttc 20580  
cccgtaatg tcagcgacgg atttaatgta gtctcgcagg cttgtatcg ttgcgcgaca 20640  
agcttgctcg tccttggcac gcacaacgta tatgcggctc tgtttggaa catcctcaac 20700  
cctaccatgc tcagagttac cattgacatg cacttgatcc tctggcaggg ccaatgatgc 20760  
gcgatcatat gattccaaaa tgacgtgagc attcgaacca ccaaagccga agttattgac 20820  
agatgcgcga cgagtcccat ctttcacagg ccagctctga gcagacatgg ggatcttga 20880  
aacattaacc ttgaaacat ataactgaat ctgcgaatgc gcaaagcctt accttgatgt 20940  
tcttttggtc aagcatcagc ttgtgtttct ttgtcaggaa ccgcgcatta gggggaatca 21000  
agcccttctc caaggccaag gccaccttga ttatactggc caggccactg gcggcttctg 21060  
tatggccaat atttgcttct acagagccaa ggtgcagagg atgtccttta aaagctgctg 21120  
aaattgctga gatttcaagg gggtcaccag ttgggtgttc agttccgtgg gcctccacgt 21180

acgagggtcaa cgacatatct agcccagcct tatcgtaaca ctcc tggatc agacttttct 21240  
gcgccacatc actcggcgca gtaattgagg gtgttttgcc atcctgggtc agcgtgtct 21300  
ctcgaatgac ggctcggata gggctcttggc ctgcacacgc gttaggaggagg gcctttatta 21360  
ccagagcggc aattccttcc ccgcgacat atccattcgc tcgaggatca aaagagtacg 21420  
agataccatc cggggacaaa aatctgtcat tgagcaacaa ggattgctta gttcaagact 21480  
ctcgatctgg aatcttcttc ggaaaactca ccccagggtt gacatcgtaa caaaaacatc 21540  
gggattgagc agaagatttg caccgataac gatggctgta tctgactccc cagtacgtaa 21600  
gctctggcac gccaaagtga gtgcgggtcaa tgcgtcgaa caggccgtgt caaccgtcac 21660  
gctgggacca cgtaagtctg agaagtgtga tatccgggtc gaaagcattg ttcctgagtt 21720  
gccagttatg aaataacgcg gaactgtctc ggggtcacga ttgagcgaat cctgatagtc 21780  
gtggtacatg acacccccaa acaccgacgt attagagcct gccataccat cgatggtgat 21840  
accggctgga tgatggtcag tgacgtttgc ttacagttag gatgaccac actacatacc 21900  
actctccagc gattcgtaga ccacctcaag cataagccga tactgaggat ccatgcactg 21960  
tccaatatta gatctctgcg tcccgggtta gatcaattga aataatcata cgtgggcgac 22020  
ctctgtggtc atgttgaaga acgcggcgtc aaataaagca ggatcctcgt cgatgaagtg 22080  
tccacccttt acgtgggtct atccagtcct ccttggagtc agtaaccaag cttcagtgat 22140  
gctcaaatct tgtgtcaaat attcaaaaca agatataaat gcatgcatgt tagatactca 22200  
cggacccgac cctttcgcca ttccgggtgt atactcctct cacattgaat cgcgaggagg 22260  
ggaccttaga ccaggcactg cctcctcttt caaccatttc ccaaagcttc tgtggactcg 22320  
ttgcatctcc agcaaatcga catcccatc caactatggc aatgggcgtg gatgtgttag 22380  
agcaagccga gcctgccatt gcggttgagg ttgcggttgc ggttgcggtt gcggttacgg 22440  
cgggggtatt gttcattcca acgttgtttc attgactgat atatcagtcg cctggtgat 22500  
aaaaccgttg atagtcttcc aacagtctac aggtccctgg catagctata gatgcataag 22560  
ctgccccga cacgtgattc atagtccggg gtttgttttc atcttggacg tgacacgata 22620  
ttcgctctgt gccatggga aaccccgac caccatgcta tgctcggggc aataccttag 22680  
aggtaccggt tcgggaggca ttgtctgtcg tcacgataat cccgagtcaa aacgccgatg 22740  
ggaaaccgtc gaacaagacg aaacaggtca ggccggccag gtagttttcg ggtataatgg 22800  
aggctgtcag aatccgatac tccgtacaca gatgcgaaat acgcatacga gctatcaaac 22860  
caaacgaatc caaaagcctt ggaaaagctt ggaaaggctt agtgggtaat cctgtcccaa 22920

ggtttgttga gggcctgagc gcaggggtggg tccgtgaagc agttggtaat tcaatttcca 22980  
acaatacaca atccccaaaa ttgtcattat cggttgacta agacaagcaa acaaaatata 23040  
tgcaggaagc gcaattcatc gcgagcaaac gatcatcatg agcatgtgac cctttcctct 23100  
tttttctact tcggaaggcg gcatgatcat ctgtcagaac tcccaatcgg gagcaatacc 23160  
ataccttacg gcacccact cagacccatg cacaaagaaa atccatgcgc cgaatattga 23220  
agccttggca acaaagcccc gtgtaactcc gaaggtatcc aaagaccgag agacgccgat 23280  
ttgagagaca cgtacggagg tccacacaaa atgttccga gtctatacac tatactccaa 23340  
actgacttct tgtctacctg ggtatcttgt tcaggttgct gtttactgag ataatgata 23400  
ccgggggggg gggggggggg ggggggtgac actggccttt cgtggacaga ataataccca 23460  
tacatccctg cgtaagtagt cgtttcgaga agaattgtgt tcgtgggtgca ttactccgta 23520  
ggcacaatat atttccattc ctcacgaagt ggccctgtcc gggcgtgac gatgcagctt 23580  
gccgcccac caaaaaagga ccacaatac agtcagatta gaaacgtcta acaggacgtc 23640  
tatgtaagag gacgtcctt tgtatgtcgg atctaggcat gacaaaataa ctatacctag 23700  
gtagtgttct gtcttattgg tcatttggcc tactttcgga acaatcttgg aagttcacat 23760  
tcctaggtat cagggaatt gattgggtgc ccagaattc tttttctcg aataaaggat 23820  
aaatttatgc ataaaaacct tggaaactga gcatagttat gagcacaat actagttttc 23880  
agtgcaattg gtctactat cctttgctt gtaccctta ccaattatac cctaggcagc 23940  
agttgacacc ggtcatgaat ccattcataa aggtggacca gatgcaggga taaggaagcg 24000  
aatctttcgc ctgctcagc ctcaggggcg cgcgccattt gttatttct tctactcatt 24060  
tccgtacct aggaactgtt cagttgtccc tcccaacccc ttgggcccga caaccttct 24120  
ccaatctacg acggcagatt atacctaggc gcctaaccga ttaggttgct cattcgattt 24180  
tgagggtatg cactttatct caagccctaa ttcccaattg aagtgccttt ccgtcccat 24240  
ttgcagagct gactagattc ttttctcaga gactacctag ctataggtac cactccaagc 24300  
tgtagcacag acctttcagc atggctgctt cgttgctacc ctctcgcttt cgcggtaggg 24360  
aatcaatgaa tcagcagcac cctctacgt cgggaaatcg ggcattgacc tccacactcc 24420  
aatttctatc caaaacggcg tgtctacacc cgatccatac cgtttgcacc atagctattc 24480  
tagctagtac cacatacgtt ggactactca aagacagctt cttccatg gcgcaaagc 24540  
ttgataaagc agaattggggc tctttggctg aaggaagtcg aagcttgatc accggcccac 24600  
agaatggctg gaagtggcag agcttcgacg gggatgcaga tgttctcgga gatttcaacc 24660

atcaagcact aatgaccttg gtattcccg ggcatatgg ggttgcatct caagcagcct 24720  
caccattcct tgctccctc cctgtgaacc tatctgtgat tgaccttccc tcaacgtcga 24780  
gccctttaac cgctattcg aaagataaag ttttcgctt cctgtggaa tacagcagcg 24840  
cgccggaact cgtggctgct gttcaagaaa tcccaacaa cagtgcgcac ctgaaattgc 24900  
aggagacgca attgatcgag atggaacgcc agatgtggat catgaaggct gccagggtc 24960  
acacaaaacg cagccttgct caatgggtgc acgatacctg gacagagtct cttgatctta 25020  
tcaagagcgc tcaaagctc gacgtggttg tcatggtgct aggttatata tcaatgcact 25080  
tgactttcgt ctactcttc ctacatga aaaaattggg atcgaagggt tggctggcta 25140  
caagcgtcct tttgtcgtca acatttgctt ttctctcgg tctcgacgtg gccataagac 25200  
taggggttcc gatgagcatg aggttgctat ccgaaggcct ccccttcttg gtggtgatcg 25260  
ttggctttga gaagagcatc actctgacca gggtgtttt gtcctatgct gtgcagcacc 25320  
gaaagcccca gaagatacag tctgaccagg gtagcgtgac agccattgct gaaagtacca 25380  
tcaattacgc cgtacgaagc gccattcggg agaagggtta caatatcgtg tgccactacg 25440  
tggtcgagat cctgtccta gttatcgggt ctgtcttagg catccaagggt gggtacagc 25500  
acttctgtgt tctagctgca ttgatcctgt tctttgactg tctgtgctg ttacattct 25560  
acactgcgat tctgtctatc aagctcgagg taaaccgctt caaacgtcat atcaacatgc 25620  
ggtacgcgtt ggaagatgag ggtctcagtc agcggacggc ggagagtgtc gcgaccagca 25680  
atgatccca agacagtgc cgtacatata tgtttgcaa tgatatgaaa ggcagcagt 25740  
ttccgaagtt caaattctgg atggctgttg gtttcttat cgtcaacctc gtcaacatcg 25800  
gtccacctt ttccaagcc tcttctagt gatcgttgc cagtatatca tcttgaccg 25860  
aaagtctgag cggatcgcc attaaacccc cgttgagcc cttcaaggta gctggaagt 25920  
gactagatga actacttttc caggcaagag ggcgcggtca atcgactatg gtcactgtcc 25980  
tcgccccat caagtacgaa ctagagtatc ctccattca ccgttgtacc tcgcagctac 26040  
acgagtatgg agttgggtgga aaaatggctg gtagcctgt caccagcctg gaagatcccg 26100  
tcctctccaa atgggtgttt gtggcacttg ccctaagtgt cgtctgaa agctatctgt 26160  
tcaaggccgc cagactggga atcaagatc ctaatctccc gagtcacca gttgateccag 26220  
ttgagcttga ccaggccgaa agcttcaacg ctgccagaa ccagacctt cagattcaat 26280  
caagtctcca agctctcag accagagtgt tcaactctac caccaccgac agtgacagt 26340  
atgcctcatt agtcttaatt aaagcatctc taaaggctac taagcgagca gaaggaaaga 26400

cagccactag tgaacttccc gtgtctcgca cacaaatcga actggacaat ttgtctgaagc 26460  
agaacacaat cagcgagttg aacgatgagg atgtcgttgc cttgtctttg cggggaaagg 26520  
ttcccgggta tgccctagag aagagtctca aagactgcac tcgtgccgtc aaggttcgcc 26580  
gctctatcat ttcgaggaca ccggctaccg cagagcttac aagtatgtg gagcactcga 26640  
agctgccgta cgaaaactac gcctgggaac gcgtgctcgg tgcattgtgc gagaacgtta 26700  
ttggctatat gccagtcctt gttggcgctc ccggtcctat tgttatcgac ggcaagagtt 26760  
atttcattcc tatggcaacc accgagggcg tcctcgctgc tagtgctagc cgtggcagta 26820  
aggcaatcaa cctcgggtggc ggtgccgtga cagtcctgac tggcgacggt atgacacgag 26880  
gcccggtgtg gaagtttgat gtccttgaac gagctgggtc tgctaagatc tggctcgatt 26940  
cggacgtcgg ccagaccgta atgaaagaag ccttcaattc aaccagcaga tttgcgcgct 27000  
tacaaagtat gcggacaact atcgccggta ctacttata tattcgattt aagactacta 27060  
ctggcgacgc tatgggaatg aatatgattt ctaagggcgt ggagcatgca ctgaatgtta 27120  
tggcgacaga ggcaggtttc agcgatatga atattattac cctatcagga aattactgta 27180  
cggataagaa accttcagct ttgaattgga tcgatggacg gggcaagggc attgtggccg 27240  
aagccatcat accggcgaac gttgtcaggg atgtcttaaa gagcgatgtg gatagcatgg 27300  
ttcagctcaa catatcga aaatctgattg ggtccgctat ggctggctca gttggcggct 27360  
tcaacgccca agctgccaat ctigcggcag ccattttcat tgccacaggt caggatccgg 27420  
cgcaagttgt ggagagcgt aactgcatca ctctcatgaa caagtaagtt gaaagcggcc 27480  
gcttacttgg aaacattcac taatcctgtt tagtcttcgc ggatcgcttc aaatctctgt 27540  
ctccatgccg tctattgagg ttggaacgtt gggcggtggt acgattctgg agccccaggg 27600  
cgcaatgctt gacatgctt gtgtccgagg atcacaccg accactccg gtgagaatgc 27660  
acgtcaactt gcgcgcatca tcggaagcgc tgttttggct ggggagctct cgctatgtgc 27720  
tgccctagcc gccggtcacc tggtaaggc gcacatggcg cacaaccgtt ctgccccggc 27780  
atcttcagcc ctttctcgaa gtgtctcccc gtcaggcgga accaggacag tcctgttcc 27840  
taacaatgca ctgaggccga gtgctgcagc tactgatcgg gctcgacgt gattaggtcg 27900  
gaatcttagg agcattcaa gctccgtacc cctccagtg gattcattgc aggaggatca 27960  
tatttttct cattggttgt tattgtcata attttcaaaa gcacaatgca atgagacagg 28020  
caggtggtag agtgaacggc cagaaagggt atctcatgtt tatatgttgt tgaaatttac 28080  
gatgcaagta gtagggaaga agaatatata aagagatggt ctttttcag agagtgttta 28140

ggctctgatcc ctcataatta tttaatgagt gaaagctttg ttcaagctat aacttactga 28200  
gtaggttgaa tgttgatctg attcattcct gaggtatcag gattgatgcc tgaacatca 28260  
atcatccatt gtcagatgcc gtaactaact aactatgaat ctcaacatag ttatatgttg 28320  
ccaatctagc cacggtgact agaaccttga gatggactta gactagacat gggctcgcggg 28380  
caatgacata tagaatcttt gaaatcgaca ttaattaagt atgtggagat tctttgtgga 28440  
ggcacggtaa tgtgtctatc tagcaacgcg gtcaagcatc agtctcaggc acagcccggg 28500  
tgtcgttttt gggtgcaatc ttccgccatc ccattccaaa ggcaaacaca aacgtgcacg 28560  
ccgtagctcc cactgctaag taaaaagtat gatcaacggc gagactgtaa gcttttacia 28620  
cccctggaag gttattcttg ctgaccacat ctctgaagcc agtcgccctt gctgccgtca 28680  
cggcctgcgt gtcgacagtg ggcgcatact tgctcaggcc agttctcaaa ccggacccaa 28740  
agacaagggt agcaaagtcc aggaagagcg atcctccaaa cgtctgtcca aacacggcga 28800  
gagaaattcc gagggcacct tgttcgggcg aaagcgtgct ttggatggcg atgataggct 28860  
ggccattgag tattgatgtc agcgtctagc gggtgcatgc tcttcttgct ttgatacaaa 28920  
gccgaaagcg tgagagatga tcaaagggtt catagcttac cgtttgcatg ccacaaccac 28980  
gaccgaagcc cgcgataaat tggtagatga ccatttcac agttgatgta tggggctgga 29040  
aggtggatac cagacctgcg cctatggcga cgagaacagc gctgcctagg gcccaaggca 29100  
aatagtatcc tgtctttcca actgggtgcgt catatgtcag tatacacgat atccaagccc 29160  
gatgtcagac gggtgtggca agaaaggagc catagaaatg gacgggggtg agaaaaatgt 29220  
gtacgcgagt ttcaattact tgcaagcca gaaaccatag ccataatgac ttgtccaaga 29280  
attccaggca acatgtacac accactcagt gtgggagaaa catccttcac agcctggaag 29340  
tagatcggta gatagtagga aaagacaagc aaggagccag agaaaaagcc cataaataaa 29400  
caagagcacc aacttgtcg ttaccagcc actgagccag gaatcatggc aacagcatcg 29460  
ccaacatgac gctcccatag cacgaacgca atcagagcaa accctccgcc acagaacagg 29520  
ccgatgatga cggaacttcg ccaggtgtag gtcgaccctc ccattctag tgcgagggaa 29580  
atcatgggtg cgaaggctgc aaagaccaca aagcctacaa ggtccagttt gcgaagtgtg 29640  
gattttatgt tggccattgg tttgtcggtc gagagtctgc tgtccgtgga tgaaattcgg 29700  
tcgggtatgg tgatgacgag aaggaggaat gcagcgacag cgccgatggg gagattgata 29760  
taaaagcctg aattccaagt gagaacatgg acaacaatca taaaaggcc aaaggtcaac 29820  
atacaccatc gccaaagtgc gtgttgagt aaagcacctc cgagcagtgg tccacagaca 29880

atggcaatct gactaactga aaacatatgt tcagacgacg aaccgttcgt ttgggggtaca 29940  
tcagatcttg agatgacata cgacccatca tcaactccaat caaaacttca tatgcgaggt 30000  
cagcgtgtac acggcaccca gcagacttcc aaaaatcgggt tcccttacct ggttgcttgt 30060  
gcttaggagc agctgttgag aggattgtga gggctccgtt gacaagacct gagcctccca 30120  
ttccagcaac ggcccgccca acaatcaaca tgggtggaaga tcttgcgga cgcgatagca 30180  
ccgagcctag ttcaaaaata cagaggaagg caaagaaagt gtacttcaag cccaagagtg 30240  
tatacaattt accggccagg ggctggagag cacagctaaa tatgatgtta gctaactctgt 30300  
tcgtacaatg aacaagggtca aggagaacag agccatactt agccagaaga taagcactgc 30360  
cgtaccaccc tacatcgttc agagagtggg actcgttgt gatatgtggg attgcctgtg 30420  
gctggagtca attgactgtg ctgcgctctg ttctgaggta gccaccatct taccgtgacg 30480  
ataatggaca tatcaaggag catcaaaaat gctacgaaag taactgaagc aaccaccagc 30540  
ccgagcttga ggctgtgat gtgctgggac ttggactcag tcgcttcgag cgtgtcattt 30600  
tgactttctt ccttctgtgg ccttggttcc ccttcttttag ggggtagagg ttctgacatc 30660  
ggcaattcc ttccgacttt tgcttcaagg ggcggtgtga atctctactg cgcggcgctt 30720  
ctatagtacc tgtgttttgg tgtatgaatg atctcgtctc cgttgtttcg ttaagggtccg 30780  
ctagcctgaa gtcagattga tggatgggga tcaggggaaa ttggcgacgt ctttaatttt 30840  
gcttttcttt gttaccggaa gtgttgcggt attagcgtgt ctgggcttat ttacgacgca 30900  
caagatgcat tgaactggcc cactgctag atctcactag tattgtgggt gtaatttacc 30960  
tatactccat attgactggg caggttttga acacaacca cccccccca tactacacat 31020  
tagttttgca tattttcctg ggggccaaaa aaaccccaaa aggttcaat attttgcggc 31080  
caatggagag tgtaactaat ttggcccaca ctccggtggt atcaatcgga tctcactgca 31140  
tatatgatga aagcaagagg gggcaggaga tacgtctttt attggctgtc tgcgcgaagc 31200  
tgggcaaatg caaataaaaa gacaaacaac cagctggaag accgggagac aaacatgggt 31260  
tacctaacac cctcgatccc aacaatgtgc atgttaatca atgtgctccg tggggagtat 31320  
gaactataac atacgaagca gccattcatg tcaaaaaaaaa aaccaggcga atgggcgtcg 31380  
tcaacggttt cacataagta ctatattgta ctaactaccc gtgagactgg agagaacagt 31440  
ctcgcgcgaa gaaacgataa gagcatcgggt catatcggtc catctcggtc taagtgtatg 31500  
agaatatcc gacgtgaatc catccgtcag tgatcaatgt ctccaagtaa ttcattcattt 31560  
caattaccct cgttttactc cgtagaatac aagaccttac tagcgcaaac aagtgggggc 31620

taacgggtgtg atctccttcc gttagggcgc ccaccteggt tccagccgta atacgacgac 31680  
ccgtctatcg cgaccccccta gccttggeca tttttggcgt tacagtaaag ctttgagag 31740  
aaacgccaag ggaaaatgct agccaccaat tctataaatt actcttcaca tgcagctagt 31800  
atcactggta agtctacggg gcacatgtaa aatttttatt acttttctaat aatctttcca 31860  
agtcttttc cagggggccc caatgcttaa aatactcaaa agacgtgaaa aacctgcaag 31920  
ccgccagtga tatcacacgt aatgcctcaa cagcctgatt ccgagccatt atatgctgtt 31980  
tgatgatctc aaattgagat ggcgagcgt ggatctggga aattggtagt gggattggta 32040  
tagaaacgta agtgcagaag accatgtaat aagtacatat ggaggctatg tgatggccc 32100  
atctagtttc ttcaatatag cgctgggtat aaaaaaagc aggggctttc tcagggtaat 32160  
gtcgagctc acaacgagt gctccactg acagggaag gcgagcgggg ctatgctacc 32220  
ttcaatttc atagaggggg gatgcacat ctccgacaat ctatagttac tcaaacaggt 32280  
acggtactaa gcaatattgt gttctctgc taatgcgaat atttccttat agcaacgtcg 32340  
caacacattt atcgtcttcc ctgaggcctt tgttgacttg ggctcttctg ctccggcttc 32400  
gtcactccaa agcacagata ggagacgaga ggccggcgtt atggttttat ttcagcgcc 32460  
aaggatttgc cagatgtgc ttggcatatc tgataggacc tatccccct ctcccggtca 32520  
gcgcattgct gatgtatga agggaagaaa agactgggtg ttatcggtcc cacttactag 32580  
acgaatagat gccgcagccc cgtgctctg tgctatcccc aaagcagtct caatctcact 32640  
caatagtcga aggttacac gcaatgtcgt gcatgcagaa gataaggcgt gcatgaatgg 32700  
gtcgagatgt gaaatgagct cgccgatatg aagattagag tgaacgagg gaagtgttc 32760  
ggctcttcca ttgtcatttc tagtggttga gccagaccag taccaatcca ttcgtgtgct 32820  
ttgcttttgt ccacaagggt gggctttcat cacctcggat agtagcagct gggaaagtga 32880  
tgtcatgatt ttgacagaca acatgtagca atgcaccgcc atgaacaagt tcttggtttg 32940  
cagacacca tctaacatgc tgctattgct gctcgtgatc acacgttctt gaagatgtag 33000  
tagcaatcta ccaaaggcat tcaaaaagtc cctatcggg tctaggaaga agctttagcg 33060  
acaatcaaga ggcagtaaac aggcagaatt gaaaatctca cagcttaaaa tttttgctt 33120  
gggccattcc acagtcaccc cgtggagtat tacctctagg tctgtgaca catccgacag 33180  
actttcgaaa aggtctcgtt gcgtgttgc ttgtttggat tgcccgatg acgagttccc 33240  
ctctacttcg aggtcaaaca gcgatggcga gacaggcgcc gttgcatcca aagggccttc 33300  
aaagtcgtag cctagatctg gtatccccga agattcattg ctgttggcat cgtcgcgaaa 33360



tgtatttggc tgaggccagc cgcgggaaa cgactcggga tcatcaaagt tgattgatgt 33420  
atcatagaat tgcagggttg ccgctgatgg ttctgataat gtttccttga gtgccgaggt 33480  
gccaatatgc gtaggtgggtg agcagtaagg tggaggagtc tctgccaatg atgagaagac 33540  
cgtagaagat gtcgcggtca tcggttgtga ggtttctgtg gctctttagt ttccagctgc 33600  
ggcttcttta tgtaaattgc gcttgggtag cctttcgtg tacacacacc ttaatccggc 33660  
ttgttgacaa cgttgacact gacacggac taaattggca ttgctaccgg tacatttgag 33720  
cttttgtgca tgacaccggt cacatgagcg tcgaaacgcg cgacggcgta ggctcgtcgg 33780  
aatcgttgca tgcggcaggg acataattat tggattaaga tcaaataatg tgaggtgaga 33840  
ctttgcatgt tcttgatct ttatgtattg gaattggaga gtaagctcgt gcaggagata 33900  
agttcaggtc gtcttgctgg aagacttact aagttatatg caaacaagtg ttttcgagcg 33960  
gacacaaaa gccaatagtc ttactatgaa tgtcttttca gtcaccgga gaaatactct 34020  
tagcctctgc tcttatgcga gctcatcaa gctgggcata catacccat ccagcgccac 34080  
gtattacact agaaagagtt ctaaaagaaa tagattcggc ccccatctg gctatcatat 34140  
atgccagatg aaatacctgt aacgtggggc ataaaaaggc aggtctagt ctaccagcag 34200  
atc 34203

<210> 2

<211> 34203

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 2

gatctgctgg tagactagag cctgcctttt tatgccccac gttacaggtt tttcatctgg 60  
catatatgat agccagatgg ggggccgaat ctatttcttt tagaactctt tctagtgtaa 120  
tacgtggcgc tggatggggt atgtatgcc agctttgatg agctcgata agagcagagg 180  
ctaagagtat ttctccgggt gactgaaaag acattcatag taagactatt ggcttttgggt 240  
gtccgctega aaacacttgt ttgcatataa cttagtaagt cttccagcaa gacgacctga 300  
acttatctcc tgcacgagct tactctccaa ttccaataca taaagatcca ggaacatgca 360  
aagtctcacc tcacattatt tgatcttaat ccaataatta tgtccctgcc gcatgcaacg 420

attccgacga acctacgccg tcgcgcggtt cgacgctcat gtgaccgggtg tcatgcacaa 480  
aagctcaa at gtaccggtag caatgccaat ttagtccgtg ctcagtgtca acgttgtcaa 540  
caagccggat taagggtgtgt gtacagcgaa aggctaccca agcgcaattt acataaagaa 600  
gccgcagctg gaactacaag agccacagaa acctcacaac cgatgaccgc gacatcttct 660  
acggctctct catcattggc agagactcct ccaccttact gctcaccacc tacgcatatt 720  
ggcacctcgg cactcaagga aacattatca gaaccatcag cggcaaccct gcaattctat 780  
gatacatcaa tcaactttga tgatcccgag tcgtttcccg gccgctggcc tcagccaaat 840  
acatttcgcg acgatgccaa cagcaatgaa tcttcgggga taccagatct aggctacgac 900  
tttgaaggcc ctttggtatgc aacggcgctt gtctcgccat cgctgtttga cctcgaagta 960  
gaggggaact cgtcatccgg acaatccaac acaagcaaca cgcaacgaga ctttttcgaa 1020  
agtctgtcgg atgtgtcaca ggacctagag gtaatactcc acgggggtgac tgtggaatgg 1080  
cccaagcaaa aaattttaag ctgtgagatt ttcaattctg cctgtttact gcctcttgat 1140  
tgtcgctaaa gcttcttctt agacccgata ggggactttt tgaatgcctt tggtagattg 1200  
ctactacatc ttcaagaacg tgtgatcacg agcagcaata gcagcatgtt agatgggtgt 1260  
ctgcaaacca agaacttggt catggcggtg cattgctaca tgttgtctgt caaatcatg 1320  
acatcacttt ccagctgct actatccgag gtgatgaaag cccaaccttg tggacaaaag 1380  
caaagcacac gaatggattg gtactggtct ggctcaacca ctagaaatga caatggaaga 1440  
gccgaagcac ttccctcggt tcaactctaat ctcatatcg gcgagctcat ttcacatctc 1500  
gaccattca tgcacgcctt atcttctgca tgcacgacat tgcgtgtaag ccttcgacta 1560  
ttgagtgaga ttgagactgc tttggggata gcacaggagc acggggctgc ggcattctatt 1620  
cgtctagtaa gtgggaccga taaccaccag tcttttcttc ccttgcatat atcagcaatg 1680  
cgctgaccgg gagaggggga ataggctcta tcagatatgc caagcacatc gtggcaaate 1740  
cttggcgctg aaaataaaac cataacgccg gcctctcgtc tctatctgt gctttggagt 1800  
gacgaagccg gagacgaaga gcccaagtca acaaaggcct cagggaagac gataaatgtg 1860  
ttgcgacgtt gctataagga aatattcgca ttagcgaaga aacacaatat tgcttagtac 1920  
cgtacctgtt tgagtaacta tagattgtcg gagatgggtgc atccccctc tatggaaatt 1980  
gaaggtagca tagccccgt cgcctttccc tgctagtga gccactcgt tntagactgc 2040  
gacattacc tgagaaagcc cctgcttttt tttataccca gcgtatatt gaagaaacta 2100  
gatcgggcca tcacatagcc tccatagtga ctattacat ggtcttctgc acttacgttt 2160

ctataccaat cccactacca atttcccaga tccagcgctc gccatctcaa ttgagatca 2220  
tcaaacagca tataatggct cggaatcagg ctgttgaggc attacgtgtg atatcactgg 2280  
cggttgagc gtttttcacg tcttttgagt attttaagca ttggggcccc gtggaaaaga 2340  
acttgaaaag attattagaa agtaataaaa attttacatg tgccccgtag acttaccagt 2400  
gatactagct gcatgtgaag agtaatttat agaattgggtg gctagcattt tcccttggcg 2460  
tttctctcca aagctttact gtaacgcaa aaatggcaa ggctaggggg tcgcgataga 2520  
cggtcgctcg tattacggct ggaaccgagg tggcggcgc aacggaagga gatcacaccg 2580  
ttagccccca cttgtttgcg ctagtaaggc cttgtattct acggagtaaa gcgagggtaa 2640  
ttgaaatgat gaattacttg gagacattga tcaactgacgg atggattcac gtcggaatat 2700  
tctcatacac ttagaccgag atggaccgat atgaccgatg ctcttatcgt ttcttcgcgc 2760  
gagactgttc tctccagtct cacgggtagt tagtacaata tagtacttat gtgaaaccgt 2820  
tgacgacgcc cattcgctg gttttttttt tgacatgaat ggctgctcg tatgttatag 2880  
ttcatactcc ccacggagca cattgattaa catgcacatt gttgggatcg aggggttag 2940  
gtaaaccatg ttgtcgccc ggtcttccag ctggttggtt gtctttttat ttgcatttgc 3000  
ccagcttcgc gcagacagcc aataaagagc gtatctcctg cccctcttg ctttcatcat 3060  
atatgcagtg agatccgatt gataccaccg gagtgtgggc caaattagtt acactctcca 3120  
ttggccgcaa aatattgaag ccttttgggg ttttttggc cccaggaaa atatgcaaaa 3180  
ctaattgtga gtaatggggg gtgtgggttg tgttcaaac ctgcccagtc aatatggagt 3240  
ataggtaaat tacaaccaca atactagtga gatctagcag tggggccagt tcaatgcac 3300  
ttgtgcgtcg taaataagcc cagacacgt aataccgcaa cacttcggt aacaaagaaa 3360  
agcaaaatta aagacgtcgc caatttcccc tgatccccat ccatcaatct gacttcaggc 3420  
tagcggaact taacgaaaca acgagagcga gatcattcat acacaaaac acaggtaacta 3480  
tagaagcgcc gcgcagtaga gattcacacc gccccttgaa gcaaaagtcg gaaggaattg 3540  
cgcgatgtca gaacctctac cccctaaaga aggggaacca aggccacaga aggaagaaag 3600  
tcaaaatgac acgctcgaag cgactgagtc caagtcccag cacatcacag gcctcaagct 3660  
cggtgtgtg gttgcttcag ttactttcgt agcatttttg atgctcctg atatgtccat 3720  
tctcgtcacg glaagatggc ggctacctca gaacagagcg cagcacagtc aattgactcc 3780  
agccacaggc aatcccat atcacaagcg agttccactc tctgaacgat gtaggtgtg 3840  
acggcagtgc ttatctctg gctaagtatg gctctgttct ccttgacctt gttcattgta 3900

cgaacagatt agctaacatc atatttagct gtgctctcca gcccctggcc ggtaaattgt 3960  
atacactctt gggcttgaag tacactttct ttgccttcct ctgtattttt gaactaggct 4020  
cgggtgctatg cgggtgccga agatcttcca ccatgttgat tgttgggcgg gccgttgctg 4080  
gaatgggagg ctccaggtctt gtcaacggag ccttcacaat cctctcaaca gctgctccta 4140  
agcacaagca accaggtaag ggaaccgatt tttggaagtc tgctgggtgc cgtgtacacg 4200  
ctgacctgc atatgaagtt ttgattggag tgatgatggg tcgtatgtca tctcaagatc 4260  
tgatgtaccc caaacgaacg gttcgtcgtc tgacaatatg ttttcagtta gtcagattgc 4320  
cattgtctgt ggacctgc tcggagggtgc tttcactcaa cagccactt ggcgatgggtg 4380  
tatgttgacc tttggccttt ttatgattgt tgtccatgtt ctacttgga attcaggctt 4440  
ttatatcaat ctecccatcg gcgctgtcgc tgcattctc cttctcgtca tcaccatacc 4500  
cgaccgaatt tcatccacgg acagcgaact ctgaccgac aaaccaatgg ccaacataaa 4560  
atccacactt cgcaaactgg acctttagg ctttgtggtc tttgcagcct tcgcaaccat 4620  
gatttcctc gcactagaat ggggagggtc gacctacacc tggcgaagtt ccgtcatcat 4680  
cggcctgttc tgtggcggag ggtttgctct gattgcgttc gtgctatggg agcgtcatgt 4740  
tggcgatgct gttgccatga ttctggctc agtggctggg aaacgacaag tgtggtgctc 4800  
ttgtttattt atgggctttt tctctggctc cttgcttgtc ttttctact atctaccgat 4860  
ctacttcag gctgtgaagg atgtttctc cacactgagt ggtgtgtaca tgttgctgg 4920  
aattcttgga caagtcatta tggctatggg ttctggcttc gcaagtaagt gaaactcgcg 4980  
tacacatfff tctccacccc gtccatttct atggtctcct tcttgccaca accgtctgac 5040  
atcgggcttg gatctgtgt atactgacat atgacgcacc agttggaaag acaggatact 5100  
atctgccttg ggccctaggc agecgtgttc tcgtcgccat aggcgcaggt ctggtatcca 5160  
ccttcagcc ccatacatca actgtgaaat gggctcatgta ccaatttatc gcgggcttcg 5220  
gtcgtgggtg tggcatgcaa acggttaagct atgaaacctt tgatcatctc tcacgctttc 5280  
ggctttgtat caaagcaaga agagcatgca accgctagac gctgacatca atactcaatg 5340  
gccagcctat catcgccatc caaagcacgc tttcgcccca acaaggtgcc ctcggaattt 5400  
ctctcgccgt gtttggacag acgtttggag gatcgctctt cctggacttt gctaaccttg 5460  
tctttgggtc cggtttgaga actggcctga gcaagtatgc gccactgtc gacacgcagg 5520  
ccgtgacggc agcaggggag actggcttca gagatgtggg cagcaagaat aaccttcag 5580  
gggttgtaaa agcttacagt ctgcctgtg atcactctt ttacttagca gtgggagcta 5640

cggegtgcac gtttgtgtt gcctttggaa tgggatggcg gaagattgca accaaaaacg 5700  
acacccgggc tgtgcctgag actgatgctt gaccgcgttg ctagatagac acattaccgt 5760  
gcctccacaa agaatctcca catacttaat taatgtcgat ttcaaagatt ctatatgtca 5820  
ttgcccgcga cccatgtcta gtctaagtcc atctcaaggt tctagtcacc gtggctagat 5880  
tggcaacata taactatgtt gagattcata gttagttagt tacggcatct gacaatggat 5940  
gattgatgtt tcaggcatca atcctgatac ctcaggaatg aatcagatca acattcaacc 6000  
tactcagtaa gttatagctt gaacaaagct ttcactcatt aaataattat gagggatcag 6060  
acctaaacac tctctggaaa aggaccatct ctttatatat tcttcttccc tactacttgc 6120  
atcgtaaatt tcaacaacat ataaacatga gatacccttt ctggccgttc actctaccac 6180  
ctgcctgtct cattgcattg tgcttttgaa aattatgaca ataacaacca atgagaaaaa 6240  
atatgatcct cctgcaatga atccactgga ggggggtacgg agcttggaat gctcctaaga 6300  
ttccgaccta atcagcgtcg agcccgatca gtagctgcag cactcggcct cagtgcattg 6360  
ttaggaacag ggactgtcct ggttccgcct gacggggaga cacttcgaga aggggctgaa 6420  
gatgccgggg cagaacggtt gtgcgccatg tgcgccttga ccaggtgacc ggccgctagg 6480  
gcagcacata gcgagagctc cccagccaaa acagcgcttc cgatgatgcg cgcaagt tga 6540  
cgtgcattct caccggggagt ggtcgggtgt gatccgcgga caccaagcat gtcaagcatt 6600  
gcgccttggg gctccagaat cgtaccaccg cccaacgttc caacctcaat agacggcatg 6660  
gagacagaga tttgaagcga tccgcgaaga ctaaacagga ttagtgaatg tttccaagta 6720  
agcggccgct ttcaacttac ttgttcatga gagtgatgca gttagcgtc tccacaactt 6780  
gcgcgggata ctgacctgtg gcaatgaaaa tggctgccgc aagattggca gcttgggcgt 6840  
tgaagccgcc aactgagcca gccatagcgg acccaatcag atttttcgat atgttgagct 6900  
gaacctgct atccacatcg ctctttaaga catccctgac aacgttcgcc ggtatgatgg 6960  
cttcggccac aatgcccttg ccccgctccat cgatccaatt caaagctgaa ggtttcttat 7020  
ccgtacagta atttctgat agggtaataa tattcatatc gctgaaacct gcctctgtcg 7080  
ccataacatt cagtgcacgc tccacgcct tagaaatcat attcattccc atagcgtcgc 7140  
cagtagtagt cttaaatcga atatataagt gagtaccggc gatagttgtc cgcatacttt 7200  
gtaagcgcgc aaatctgtg gttgaattga aggcttcttt cattacggtc tggccgacgt 7260  
ccgaatcgag ccagatctta gcagcaccag ctcggtcaag gacatcaaac ttcacacacg 7320  
ggcctcgtgt cataccgtcg ccagtcagga ctgtcacggc accgccaccg aggttgattg 7380

ccttactgcc acggctagca ctagecagca ggaagccctc ggtgggtgcc ataggaatga 7440  
aataactctt gccgtcgata acaataggac cggcgacgcc aacagggact ggcatatagc 7500  
caataacgtt ctgcacaat gcaccgagca cgcgttccca ggcgtagttt tcgtacggca 7560  
gcttcgagtgc ctccagcata cttgtaagct ctgcggtagc cgggtgtcctc gaaatgatag 7620  
agcggcgaaac cttgacggca cgagtgcagt ctttgagact cttctctagg gcatacccg 7680  
gaacctttcc cgcacaagac aaggcaacga catctcctc gttcaactcg ctgattgtgt 7740  
tctgttcag caaattgtcc agttcgattt gtgtgcgaga cacgggaagt tcactagtgg 7800  
ctgtctttcc ttctgtcgc ttagtgacct ttagagatgc ttaattaag actaatgagg 7860  
catcaactgc actgtcgggtg gtggtaggag tgaacactct ggtctgagga gcttggagac 7920  
ttgattgaat ctgaggggtc tggttctggg cagcgttgaa gctttcgcc tggtaagct 7980  
caactggatc aactgggtga ctggggagat taggatcttt gattccagct ctggcggcct 8040  
tgaacagata gctgttcaga gcgacactta gggcaagtgc cacaacacc catttggaga 8100  
ggacgggatc ttccaggctg gtgagcaggc taccgaccat tttccacca actccatact 8160  
cgtgtagctg cgaggtacca cggatgaatgg aaggatactc tagttcgtac ttgatggggg 8220  
cgaggacagt gaccatagtc gattgaccgc gccctcttgc ctggaaaagt agttcatcta 8280  
gtccacttcc agtaccttg aagggtcaa gcgggggttt aatggccgat ccgctcagac 8340  
tttcgggtcca agatgatata ctggacaacg atccactaga agaggcttgg aaaagggtgg 8400  
agccgatgtt gacgaggttg acgataagga aaccaacgac catccagaat ttgaacttcg 8460  
gaacactgct gcctttcata tcattgcaa acagatatgt acgtgcaactg tcttgggcat 8520  
cattgtgtgt cgcgacactc tccgcgtcc gctgactgag accctcatct tccaacgcgt 8580  
accgatgtt gatatgacgt ttgaggcgtt ttacctcgag cttgatagac agaatcgag 8640  
tgtagaatgt aaacagcagc agacagtcaa agaacaggat caatgcagct agaacacaga 8700  
agtgtgttag ccaccttgg atgcctaaga cagcaccgat aactaggagc aggatctcga 8760  
ccacgtagtg gcacacgata ttgtaacct tctccgaat ggcgcttcgt acggcgtaat 8820  
tgatgggtact ttcagcaatg gctgtcacgc taccctggtc agactgtatc ttctggggct 8880  
ttcgggtgctg cacagcatag gacaaaacag ccctggtcag agtgatgctc ttctcaaagc 8940  
caacgatcac caccaagaag gggaggcctt cggatagcaa cctcatgctc atcggaacct 9000  
ctagtcttat ggccacgtcg agaccgagga gaaaggcaaa tgttgacgac aaaaggacgc 9060  
ttgtagccag ccaaaccttc gatcccaatt tttctatgct gaggaagagt gagacgaaag 9120

tcaagtgcac tgatatataa cctagcacca tgacaaccac gtogagcggt tgagcgctct 9180  
tgataagatc aagagactct gtccaggtat cgtgcaccca ttgagcaagg ctgcgttttg 9240  
tgtgagccct ggcagccttc atgatccaca tctggcggtc catctcgatc aattgcgtct 9300  
cctgcaattt cagggtcgga ctgttggttg ggattttctg aacagcagcc acgagttccg 9360  
gcgcgctgct gtattccaca gagaaggcga aaactttatc ttgcgaatag gcggttaaag 9420  
ggctcgacgt tgagggaagg tcaatcacag ataggttcac agggagggga gcaaggaatg 9480  
gtgaggctgc ttgagatgca accccatatg accccgggaa taccaaggtc attagtgtt 9540  
gatggttgaa atctccgaga acatctgcat ccccgtcgaa gctctgccac ttccagccat 9600  
tctgtgggcc ggtgatcaag ctccgacttc ctccgaccaa agagcccat tctgctttat 9660  
caacgtttgc ggggccatgg aagaagctgt ctttgagtag tccaacgtat gtggtactag 9720  
ctagaatagc tatggtgcaa acggtatgga tcgggtgtag acacgccgtt ttgगतगaa 9780  
attggagtgt ggaggtcaat gcccgatttc ccgagcgtag aggggtgctgc tgattcattg 9840  
attccctacc gcgaaagcga gagggtagca acgaagcgac catgtgaaa ggtctgtgct 9900  
acagcttgga gtggtaccta tagctaggta gtctctgaga aaagaatcta gtcagctctg 9960  
caaatgggga cggaaaagca cttcaattgg gaattagggc ttgagataaa gtgcatacct 10020  
ccaaaatcga atgagcaacc taatcggtta ggcgctagg tataatctgc cgctgtagat 10080  
tggaggaagg ttgttcggcc caaggggttg ggagggaaa ctgaacagtt cctaggtacg 10140  
ggaaatgagt agaagaaaat acaaatggc gcgcgcctt gaggtgagg cagcggaag 10200  
attegettcc ttatccctgc atctggtcca ctttatgaa tggattcatg accggtgtca 10260  
actgctgcct aggggtataat tggtaagggg taccaagcaa aggatagtag gaccaattgc 10320  
actgaaaact agtatttgtg ctcataacta tgctcagttt ccaaggtttt tatgcataaa 10380  
tttatecttt attcgagaaa aaagaattct ggggacacca atcaattgcc ctgataccta 10440  
ggaatgtgaa cttccaagat tgttcgaaa gtaggcaaaa tgaccaataa gacagaacac 10500  
tacctaggta tagttatttt gtcatgccta gatccgacat acaaaggagc gtcctcttac 10560  
atagacgtcc tggtagacgt ttctaactct actcgatttg tggtcctttt ttggtgggac 10620  
ggcaagctgc atcgatcacg cccggacgag gccacttcgt gaggaatgga aatatattgt 10680  
gcctacggag taatgcacca cgaaacacat tcttctcgaa acgactactt acgcagggat 10740  
gtatgggtat tattctgtcc acgaaaagcc agtgtcaacc ccccccccc ccccccccc 10800  
cggtatcatt tatctcagta aacagcaacc tgaacaagat acccaggtag acaagaagtc 10860

agtttggagt atagtgtata gactcgggaa catttttgtt ggacctccgt acgtgtctct 10920  
caaatcggcg tctctcggtc tttggatacc ttcggagtta cacggggctt tgttgccaag 10980  
gcttcaatat tcggcgcagtg gattttcttt gtgcaggggt ctgagtgggg tgccgtaagg 11040  
tatggtattg ctcccgattg ggagttctga cagatgatca tgccgccttc cgaagtagaa 11100  
aaaagaggaa agggtcacat gctcatgatg atcgtttgct cgcgatgaat tgcgcttctt 11160  
gcataatatt tgtttgcttg tcttagtcaa ccgataatgc aaattttggg gatttgttat 11220  
tgttggaaat tgaattacca actgcttaca ggaccacccc tgcgctcagg cctcaacaa 11280  
accttgggac aggattaccc actaagcctt tccaagcttt tccaaggctt ttggattcgt 11340  
ttggtttgat agctcgtatg cgtatttcgc atctgtgtac ggagtatcgg attctgacag 11400  
cctccattat acccgaaaac tacctggccg gctgacctg tttcgtcttg ttcgacgggt 11460  
tcccatcggc gttttgactc gggattatcg tgacgacaga caatgcctcc cgaaccggta 11520  
cctctaaggt attgccccga gcatagcatg gtggtccggg gtttcccatg ggacacagagc 11580  
gaatatcgtg tcacgtccaa gatgaaaaca aaccccgaaac tatgaatcac gtgtcggggg 11640  
cagcttatgc atctatagct atgccaggga cctgtagact gttggaagac tatcaacggg 11700  
tttatcacca gggcgactga tatatcagtc aatgaaacaa cgttggaatg aacaataccc 11760  
ccgccgtaac cgcaaccgca accgcaaccg caaccgcaac cgcaatggca ggctcggctt 11820  
gctctaacac atccacgccc attgccatag ttggaatggg atgtcgattt gctggagatg 11880  
caacgagtcc acagaagctt tgggaaatgg ttgaaagagg aggcagtgcc tgggtctaagg 11940  
tcccctcttc gcgattcaat gtgagaggag tataccaccc gaatggcgaa agggtcgggt 12000  
ccgtgagtat ctaacatgca tgcatttata tcttgtttg aatatttgac acaagatttg 12060  
agcatcactg aagcttggtt actgactcca aggatgactg gatagaccca cgtaaagggt 12120  
ggacacttca tcgacgagga tctgcttta ttgacgccg cgttcttcaa catgaccaca 12180  
gaggtcgcca gcgtatgatt atttcaattg atctaaccgg ggacgcagag atctaattt 12240  
ggacagtgca tggatccgca gtatcggtt atgcttgagg tggctacga atcgctggag 12300  
agtggtatgt agtgtgggtc atcctcactg taagcaaagc tcaactgacca tcatccagcc 12360  
ggtatcacca tcgatggat ggacaggctt aatacgctcg tgtttggggg tgtcatgtac 12420  
cacgactatc aggattcgt caatcgtgac cccgagacag ttcgcgtta tttcataact 12480  
ggcaactcag gaacaatgt ttcgaaccgg atatcacact tctacgactt acgtgggtccc 12540  
agcgtgacgg ttgacacggc ctgttcgacg acattgaccg cactgcactt ggcgtgccag 12600



agcttacgta ctggggagtc agatacagcc atcgttatcg gtgcaaatct tctgtcaat 12660  
cccgatgttt ttgttacgat gtcaaacctg gggtaggttt tccgaagaag attccagatc 12720  
gagagtcttg aactaagcaa tccttggtgc tcaatgacag atttttgtcc ccgatggta 12780  
tctegtactc ttttgatcct cgagcgaatg gatatggtcg cggggaagga attgccgctc 12840  
tggtataaaa ggccctccct aacgcgttgc gagaccaaga ccctatccga gccgtcattc 12900  
gagagacagc gctgaaccag gatggcaaaa caccgcgaat tactgcgccg agtgatgtgg 12960  
cgcagaaaag tctgatccag gagtgttacg ataaggctgg gctagatatg tegttagact 13020  
cgtacgtgga ggcccacgga actggaacac caactggtga ccccttgaa atctcagcaa 13080  
tttcagcagc ttttaaagga catcctctgc accttggtc tgtgaaagca aatattggcc 13140  
atacagaagc cgccagtggc ctggccagta taatcaaggt ggccttgcc ttggagaagg 13200  
gcttgattcc ccctaatgcg cggttcctgc aaaagaacag caagctgatg cttgaccaa 13260  
agaacatcaa ggtaaggctt tgcgcattcg cagattcagt tatatgttc aaaggttaat 13320  
gtttcaaaga tccccatgtc tgetcaagac tggcctgtga aagatgggac tegtgcgca 13380  
tctgtcaata acttcggctt tgggtggtcg aatgetcag tcattttgga atcatatgat 13440  
cgcgcacatc tggccctgcc agaggatcaa gtgcatgtca atggtaactc tgagcatggt 13500  
agggttgagg atggttccaa acagagccgc atatacgttg tgcgtgcaa ggacgagcaa 13560  
gcttgtcggc gaacgatagc aagcctgcga gactacatta aatccgtgc tgacattgac 13620  
ggggaaccct tctcgccag cctcgctat aactagget ctgcgcgttc cattctgcca 13680  
tggaagtcag tgtatgtagc agacagcctt ggcgcccttg tttctgcct cagcgatgag 13740  
tccaatcaac caaaacgagc gaatgagaaa gtacggctcg gatttgtatt caccggtcag 13800  
ggggcgcagt ggcatgcaat gggcagagag ctggtcaata cattcccagt attcaaacag 13860  
gcgattcttg aatgtgatgg ctacatcaag caactgggcg cgagttggaa ttttatgggt 13920  
aagttgcgag cccgggaaaa gtaatactgt atcaagcttg aggtactaac attcaattgc 13980  
acagaggagc tccaccgtga tgagctgacg actcgggtaa atgatgccga atacagtcta 14040  
ccactgtcaa ccgctatcca aattgcactt gtgcgtctcc tttggtcag gggaattcgg 14100  
ccaacgggga taaccagtca ctcaagtga gaggtgctg ctgcctacgc agctggggct 14160  
ttatccgcgc ggtcgccat tgggatcact tatatacgc gtgtattgac cactaagccc 14220  
aagcccgc at tggcagcaa aggaggaatg atggcggtgg gtcttggtcg cagtgaagcc 14280  
aatgtttaca tttecgctct caaccaggag gacggctgtg tgggtggttg atgtatcaac 14340

agtc aatgta gtgtgacggt gtcgggagat ttgggtgcaa tcgagaaact tgaaaagttg 14400  
ttacacgcgc atggcatctt taccaggaaa ctgaaagtca ctgaagcctt ccattcaage 14460  
cacatgcgac caatggcaga tgcctttggg gcgtcactga gagatctgtt caactcggat 14520  
aacaacaacg acaatcccaa tgctgacacc tcaaagggtg tattatatc atcacctaag 14580  
actggtagtc gcatgaccga tcttaaattg ctattggatc ccacacactg gatggatagt 14640  
atgctacagc cggtagagtt cgagtcctca ctccgcgaga tgtgctttga tcccaacacc 14700  
aaagagaaag ccgtcgatgt gattattgaa atagggcctc acggagcgct tgggtgtcca 14760  
atcaaccaag tcatgcagga tctgggtctg aaaggaacag atataaacta tctcagttgc 14820  
ctttctcgcg gcagaagctc gttggagaca atgtatcgtg ctgctacgga gttgataagc 14880  
aagggttatg ggctcaaaat ggacgtata aactttctc atggaagaaa agagcccaga 14940  
gtgaaggtac tgagcgatctt gccggcgta ccttggaatc accaaaccgc ttattggaga 15000  
gagcctcgcg gcagtcgtga gtccaaacag agaaccctc cgcctcacac ttgataggc 15060  
tcacgggaat ctctctctcc tcatttcgcg cctaaatgga aacatgttct ccgtctgtca 15120  
gatattccat ggatacgaga tcacgtcgtt ggttcgagca tcctctttcc gggagctggc 15180  
ttcatcagca tggccatcga ggggttttca caagtctgcc caccagttgc gggggctagc 15240  
atcaactaca acttgcgta cgttgaaact gcgcaggctc tcataatacc cgctgatgca 15300  
gaagcagagg ttgacctgc ctaacgatc cgttcattgt aggaagggtc cctcggcaca 15360  
aagaactggc atcaattttc tgtgcactca atttcgggcg aaaataatac ctggacagaa 15420  
cactgcaccg gattaatacg ttcggagagc gaaagaagcc accttgactg ttcaactgtg 15480  
gaagcctcac gcaggttgaa tctaggctca gataaccgga gcattgatcc caacgatctc 15540  
tgggagtcc taccgcgaa tgggatatgc caccgacca tttttcagaa cattcagcga 15600  
attcaaaaca atggacaggg ctggttttgc agattttcca ttgctgacac tgccctgggt 15660  
atgcctcact cgtacgagaa tcgacacatc gtccatccta ctactctgga ctcggtgatc 15720  
caggcggcat acacggtgtt accctacgcg ggaacacgta tgaaaacggc catggtacca 15780  
aggaggctaa gaaatgtcaa aatatcctct agcctggctg acttgaggc tggatgatgct 15840  
ctggacgcac aggccagcat caaggatgc aactctcaat ccttctctac cgacttgga 15900  
gtgtttgatg actatgatag cggttcttct cctcggacg gaatcccagt catagagatt 15960  
gaaggccttg tttccagtc ggttggaagc agcttctctg accaaaagtc agactccaac 16020  
gacacagaaa atgcctgcag ctctgggtt tgggcccctg acatcagctt ggggtgactcc 16080

acttggctca aagaaaagtt gagcactgag gctgagacga aagaaacgga actcatgatg 16140  
gacctccgaa gatgcacgat caactttata caggaggctg tcaactgattt gacaaattct 16200  
gatatccaac atctggatgg ccaccttcag aagtatttcg attggatgaa tgtccaattg 16260  
gaccttgcga gacaaaacaa gctcagccca gccagttgcg actggctaag tgacgatgct 16320  
gagcagaaga aatgcctaca ggccagagtc gctggagaaa gcgtcaatgg cgagatgatt 16380  
tctcgtctag gacctcagtt aatagcaatg ctacgccgag aaacagagcc acttgagttg 16440  
atgatgcaag atcagctgct aagcagatac tacgtcaacg caatcaaattg gagccgatca 16500  
aacgcacaag ccagcgagct gatccgactt tgcgccaca agaaccgcg ttctcgcatt 16560  
ttggagattg gcggaggcac gggcggctgc acaaagctta ttgtcaatgc attgggaaac 16620  
accaagccga tcgatcgtta tgacttcacc gatgtgtctg ccgggtttt cgagtcggcg 16680  
cgtgagcaat ttgcggattg gcaagacgtg atgactttca aaaaattgga tattgaaagc 16740  
gatcccgagc aacaagggtt tgaatgtgcc acctacgatg tggctcgtggc ttgccaggtc 16800  
ctgcatgcaa ctgatgcat gaaacgaaca ctgagtaacg ttcgaaaatt gctcaagcct 16860  
gggggcaact tgatttttgt tgagactacc agggatcagc tcgatttgtt ctttaccttc 16920  
ggactgttgc caggtttgtg gctcagttag gagcctgagc ggaagtcgac gccatcgctc 16980  
actaccgatc tttggaacac catgtttggac acgagcgggt tcaacgggtg ggaattggag 17040  
gttcgtgatt gtgaagacga tgagttttac atgatcagca caatgctatc gacggctaga 17100  
aaagagaata caaccccgga tacagtggca gaatcggagg tgcttttgct gcacggagcg 17160  
ctccgacctc cttcatcttg gctggaaagt ctccaggcag caatttgtga aaagaccagt 17220  
tctagcccat cgatcaacgc tctgggcgag gtagatacca ctggaaggac atgcattttt 17280  
cttggggaaa tggagtccct gctccttgga gaggtgggaa gcgagacctt caaatccatc 17340  
accgcatgct tgaataactg caacgcactt ctctgggtgt ctagaggagc agccatgagc 17400  
tccgaggatc catggaaagc tctacatatt ggtctgctgc gtaccatccg caacgaaaat 17460  
aacgggaagg aatatgtatc gttggatctc gatccttctc gaaacgcata caccacgag 17520  
tccctgtatg ctatctgcaa tatcttcaat ggccgcctcg gcgaccttc cgaagacaag 17580  
gagtttgaat ttgcagagag aaacggcgct atccacgtac cgcgactttt caatgacctg 17640  
cactggaagg accaagaagc ggttgaggct acactgcagc cgttcgagca acccgggcgt 17700  
cgtctgcgga tggaggttga gacgccaggc ctcttagact ccttgaatt tcgagacgac 17760  
gaaggacgtg aaggcaagga tcttcggat gattgggtag aaatcgaacc caaagctttc 17820

ggctcgaatt ttccggatgt catggttgcc atgggtcaat tggaggccaa ccgtgtgatg 17880  
ggcttcgaat gcgccggagt gatcacaag ctccgtggag ctgctgccgc tagccaaggc 17940  
ctcagattag gggaccgcgt atgtgacta ctgaaaggcc attggggcgc cagaacacag 18000  
acgccgtaca ctaatgtcgt ccgtattccg gacgaaatgg gcttcccaga agccgcttcg 18060  
gtccccctgg ctttactac cgcataatatt gcgctttata ccacggcaaa gctacgacga 18120  
ggcgaaagag tcttgatcca cagtggagct ggaggcgctg gtcaagcagc gatcattttg 18180  
tcccagcttg cgggtgccga ggtcttcgtc acagcgggaa ctcaagccaa gcgtgacttt 18240  
gtcggcgata aattcggcat caatccggat catatcttct cgagcaggaa tgacttattc 18300  
gtcgacggca tcaaagccta cacggggcgga cttggcgctt atgtcgttct aaactcattg 18360  
gcaggtcaac tcttccaagc aagctttgac tgcattggcc aattcggcag atttgttgag 18420  
attggaaaaa aggacctgga gcaaacacgc agacttgaca tgctgccatt caccggggac 18480  
gtctctttca catcaattga tcttctctcg tggcaaagag ccaaaagtga agaagtatcc 18540  
gaagcgttga accatgtcac aaaactctc gagacaaaag cgattggctt gatttgtcca 18600  
atccagcagc actccttgtc aaacatcgag aaggccttcc gtacgatgca gagtggtcag 18660  
catgttgga aagttgttgt caatgtatct ggggacgaac tggctccagt cggcgatgga 18720  
gggttctcgc tgaagctgaa gcctgacagt tcttacctag ttgctgggtg gctgggggga 18780  
attggaaagc agatctgtca gtggcttgtt gatcatggcg cgaagcactt gattatccta 18840  
tcgagaagtg caaaggccag tccattcata accagcttgc aaaatcaaca gtgcgctgtc 18900  
tatctacacg catgtgacat ctcatgcaa gatcagggtca ccaaggtgct ccggttgtgc 18960  
gaagaagcac atgcaccgcc aattcgaggt atcatacaag gtgccatggt tctcaaggac 19020  
gcgcttctat cgcgaatgac attggatgaa tttaatgcag caacacgccc aaaagtacag 19080  
ggtagtttgt atcttcacaa gatcgcacag gatgttgact tcttcgtgat gctctcatcc 19140  
cttggtgggg tcatgggtgg ggcaggccag gccattacg cagctgctgg tgcattccag 19200  
gacgcacttg cgcaccaccg gagagcccat ggcatgccg ctgtcaccat tgacttgggc 19260  
atggtcaagt ctgttgata cgtggctgaa actggccgtg gtgtggccga ccggctcgct 19320  
agaataggtt acaagcctat gcatgaaaag gacgtcatgg atgtgttgga gaaggcaatc 19380  
ctgtgttctt cccctcaatt tccatcacct cccgcagctg tggttacagg aatcaacaca 19440  
tccccgggtg ctactggac cgaggcaaac tggatacagg aacagcggtt tgtgggactt 19500  
aaataccgcc aagtccttca tgcagaccaa tctttgtct cttegcataa aaaaggacca 19560

gatggcgtgc gggcccaact aagcagggtc acctctcag acgaggccat ttctatcgtc 19620  
ctcaaagcaa tgacggaaaa gctgatgca atgtttggtc tggcagaaga cgacatgtcc 19680  
tcgtccaaaa acctggcagg tgcggcgta gactcactcg tcgccattga acttcgaaac 19740  
tggatcacat ctgaaatcca tgttgatgtg tcgatctttg agtcatgaa tggtaacacc 19800  
atcgccggcc tcgtcgagtt agttgtggcg aaatgcagtt aagttgaagg gttcagtga 19860  
gccttttgtc tggccaagcg ggtatagctc gacggaggta tagtacgaag gagcatagcg 19920  
gccatggtct gaagcctgaa tccaatctga atcgagcctg ggctgagcct gactatttaa 19980  
tgctgactt ctggatagca gtaaatagag atacctgaaa taccattaca gtggccctga 20040  
gaagcaacaa agtacacatg tgcactcgtt ctggaagtcg gaagagtga tgctttttat 20100  
actaccaggg aagctgtctt agcacctcgg aggcttgact gtcaaaagtt ctctcttttt 20160  
ctctccatta tgattccgcg aagccttgta aatgcgcgtt gaacggtcga aaggcgttgg 20220  
cacgggcagt gggtagcat tgtggatatg tagtcggaag gcgggaggga gtacttgtgt 20280  
ccacgtcgtt gcgcgcctct ctctttcgcc tagtcgggga tgttgagtag gaacatcaag 20340  
acttaacaga gcctaagccc tcgtcatcgt aagcgccagt caacgcctga gagaatgggg 20400  
agatcggtag ttgtaccggg agaaaagctt cattactgcc gacttcccta cgtggcgggtg 20460  
tagctggcgg tatagaagca gatggccgct ctgcgtagca ggaatacaca ctctctccct 20520  
tctctctctc tgtgtttctg tctctcgac atagccaaag tctacaccac gtctgattac 20580  
aaagaaggca tcacaatcga ataaaatgcg ttttatttta ctaacctact cgactaatac 20640  
agcacctagt ttctctggga cggaaactat tggaataagc ctggggacgg atgcatattt 20700  
gttttagttt gcgtgttata tcttagcacc ggtcatgagg gagcgggatg tcctcgttgc 20760  
gccggcgtag catgagcttt gtggttgat gcatacgaac gctaaaagcg tgacggtagt 20820  
atttgcacg gtctcctggt acaggcttca catcacttg aatcagtata tgagcgagga 20880  
gaatcttgat ttctctcgag gcgaagaacc gcccgggaca agcgcgtggg ttccagccga 20940  
agccgatgtg atcacgttg gtattctcca attgagcggg gaaggccttg tctggatcct 21000  
cgcgcatgcg cataaatcgg tagggatcat aattttcggg gttttccac acatcagggt 21060  
tgttcatgcg gtctgcagcc acagcggcca actcgccctt gggaatgaag aggccattgg 21120  
atagagtgat gtctctgaga gcggtactgc gcatagtggc gcactcgacc ggcttgattc 21180  
gtgcgtctc tttcatgcag ctgtcgagga gcttcagctt gaacagagag gcaggcgtcc 21240  
agcccccttc tccgattaca gtgcggatct cttggcggag aggctgaata aggtctgggt 21300

gcctggcaat gtccacaagg gcaccgacga aaagatccgt cgaggcgtag atgccggcga 21360  
aatccatagc gagctgagca cccgccacat cgtaccagcg gccgtcggcg gtgtcttcaa 21420  
accattgcat ggtatcgacg tactggggcg gctgcacgcc cttcgctaca catgcggcct 21480  
tttcagcacg tcgtcgctga atctcaggat caatgatctt tcgtgcgcgg cgcacttggg 21540  
cacgcaattt gcgtccttgc ggttgaaacc agtgagcgag cggtcgcagt agcatgggcc 21600  
atacggaag ttggcgagct tgtaccgcca cactcacggc atggttcttt gcaatatcca 21660  
gccactctc attgtggcag attttgtcgc cgaccataat gagtgtgact gttcgtgtga 21720  
caaggtccaa tccattggaa tagacagggt cggtttgcca ctctagtata ttcgcggtat 21780  
gtcagccaga ggctcaatgc tcaagacaga aaaattgaca cttaccctcg cttttaccga 21840  
acaacttggc aatagtagcg tcggccaagg tagccaatgg ctttgtgtac ttgggggctt 21900  
gggtttgtaa ctggttcaaa acaactttgt tgacaagatg tgcactctgg cagatttctt 21960  
tgaaccgctc gaatccaggg agatgagagt gaaagtccta tacattcctc agaattcttag 22020  
agacgtcatt gagtacaac aatggaaaat tcagaggcca tacatccgcc aaaaacttgt 22080  
acatgcacat atctttgatt ttccgaaact cgtcggccat ggacgatggg aggatgggtgc 22140  
aatagccgga atcaacaatg aagcgcaggg gcttgtcgtt ttctgagaac caagcttcga 22200  
tccagctcgg accatacgta tcgaagtcct gcttagccct catggtcgtc aactcccacc 22260  
atTTTTTggg attatagact tgcagttcgg actggcgccc ccgcaaacgg taggcgatga 22320  
gactaagaag cactgcgacc gccacaaggg cttgaggggt cgatacccat tggtagcatt 22380  
cgacggtcag aagaacctgg ccgagcattg cgtgagacag ataggacctg tgcacaccag 22440  
tggaagagaa gaaagagcga agaattgagag cgctgcgacg gtttataatc gaataacagc 22500  
actaatgctt ctgggatttt gtggccgaga gcactcttcc agtcaacctt gaaaaaaaaa 22560  
aaaccccccc cccaatcgaa gtttacctgg atggggcagt tcggttgttt ctttaggag 22620  
cagcttcacc gagcagcaca agaacaatcc gagtgaataa ctcggtttca cttgataca 22680  
gccaatgat attcacgttt gattcattca gcctcgtgtg accgaataac gccgtatgga 22740  
ggaatggcta ttcgtgcacc gaatgacgcc gggagggttt gctaggtgcc gagcttgcatt 22800  
tgctgggaag tgggggcatt tgagtactag aatggatctt gaaattgtcc gaattagat 22860  
gagtactgat acgtgcaagt aatatataac acggtatcgg ttgcaaggcc ggcttgttcg 22920  
ctcagagatt caactctgcg attctgtaag aacaaatgtt gtgcccggca tgcagtgaga 22980  
agatctactg acgcaagaca aggtttaatc ccaatctat cgcccaaaaa caggatcagc 23040

agttatggat caagccaact atccaaacga gccaatgtg gtagtgggaa gcggttgctg 23100  
gtttccaggt ggtgtcaaca caccatcaaa actttgggag ctgctcaaag agccccggga 23160  
tgtacagacc aagatcccta aggagagatt tgacgtcgat acattttaca gccccgatgg 23220  
cactcacccc gggcgcacga acgcaccctt tgcatacttg ctgcaggagg atctacgcgg 23280  
ttttgatgcc tctttcttca acatccaagc tggagaggcc gaaacgattg acccacagca 23340  
aaggctgctg ctggagacgg tctatgaagc tgtatccaac gcaggcctac ggatccaagg 23400  
ccttcaagga tectctactg ctgtgtacgt cggtatgatg acgcatgact atgagactat 23460  
cgtgacgct gaattggata gtattcctac atactctgcc acgggggtag ctgtcagtgt 23520  
ggcctccaac cgtgtatcat acttcttcca ctggcatggg ccgagtgtga gtgccactca 23580  
ttgagcgagc ccgacttctg caagtgtga cagattcctg actgattctg cagatgacga 23640  
tcgacacagc ctgtagttca tcttagctg ccgtgcattt ggccgtccaa cagcttagaa 23700  
cgggcgagag taccatggcg gttgcagccg gtgcgaattt gatattgggc cccatgacct 23760  
ttgtaatgga gagcaaattg aacatgctgt ccccaatgg tagatctga atgtgggatg 23820  
ctgctgccga tggatatgcc agaggagtaa gttgacaatg catcaattcc tttcaaaaaa 23880  
agcaagatgg cactgacctc ctgtaactgc ttttaggaa ggtgtttgct ctattgtcct 23940  
gaaaacgctg agccaggcac tgcgcgacgg ggacagtatc gagtgtgtta tccgagagac 24000  
cggatatcaac caagatggcc gaacgacagg tatcacaatg ccaaaccata gcgcacaaga 24060  
agccctcatt cgggccacat atgccaaggc tggctttgat attaccaacc cccaggaacg 24120  
ctgccagttc tttgaagccc atggtaagtg gtattcctg gaagtatcag ccttatggaa 24180  
gttgcaaaa gtctctctct cctaacacg aagatcccag gaactggtac accagccggt 24240  
gaccacaggg aagctgaggc tattgcaaca gccttcttcg gacacaagga tggacaatc 24300  
gacagcgacg gcgagaaaaga tgagcttttt gtcggcgaca tcaagacagt tctcggtcac 24360  
acggaaggca ctgctggtat tgcgggctta atgaaggcat cgtttgctgt acgaaatggc 24420  
gtgatccgc caaacctgct gtttgagaag atcagtcctc gtgtcgctcc gttctatacg 24480  
cacttgaaaa ttgcaacgga ggccacagaa tggccgattg ttgcgccgg gcagcctcgc 24540  
agagtcagcg ttaattcatt tggtaaggat tcaactgcac ttcttgagaa cgaaagtga 24600  
gttagctaaa catataaaca catcaggatt tgggtgtaca aatgcccatg ctattatcga 24660  
agagtatatg gctcctccac acaagccgac agcagtggta acagaggtga cctcagatgc 24720  
agatgcatgc agcttgcccc ttgtgctttc atcgaagtcg cagcgctcca tgaaggcaac 24780

gctagaaaat atgtccaat ttctggaaac gcatgatgac gtggacatgc atgatatcgc 24840  
atatacetta cttgagaaac ggtctatctt gcccttccgt cgtgcgattg cagcacacaa 24900  
caaggaagta gcccgcgcgg cactggaggc tgccatcgcg gacggtgagg tcgtcaccga 24960  
cttccgcacc gacgcgaatg acaaccctcg cgtactaggt gtctttactg gccaaaggtgc 25020  
acagtggccg ggcatgctga agaagctcat ggtgggtatg ccatttgtga gaggcattct 25080  
cgaagagctg gataattcac tgcaaacact gcctgaaaag tatcggccta cgtggacact 25140  
gtatgaccag ctcatgcttg aaggggatgc ctcaaagtc agactcgcca gcttctccca 25200  
gcctctatgc tgcgccgtac aaatcgttct ggccgactt ctgctgcag ctggtatcga 25260  
gttcagtga attgtcgcc acagttcagg tgagattgcc tgtgccttg cggcaggatt 25320  
catcagtgc actcaagcta tccgtattgc gcatctgct ggagttgtgt ccgcggagca 25380  
tgctcttct ccaagcggcc agacaggcgc tatgctagcg gcaggtatgt cgtacgatga 25440  
cgcaaaggaa ctatgcgagc tcgaagcctt tgagggtcgg gtctgcgtcg ccgctagcaa 25500  
ttcaccggat agtgtgacct tctccggcga catggatgct atccagcacg ttgaaggtgt 25560  
cttggaggat gaatccactt ttgccagaat cttgagagtt gacaaggcct accattcgca 25620  
tcacatgcac ccattgcgag ctccatatgt caaggcattg ctggagtgcg actgtgctgt 25680  
tgccgatggc caaggtaacg atagtgttc ttggttctct gccgtccacg agaccagcaa 25740  
gcaaatgact gtacaggatg tgatgcccgc ttattggaaa gacaatctcg tctctccggt 25800  
cttgttctcg caggtgtgc agaaagcagt catcactcat cgtctaactg acgtcgccat 25860  
cgaaattggc gccaccctg ctctcaaggg tccgtgtcta gccaccatca aggatgctct 25920  
tgccggtgtg gagctgccgt ataccgggtg cttggcacga aacgttgacg atgtggacgc 25980  
ttttgtgga ggtctgggat acatttggga gcgtttcgga gttcggagta tcgacgccga 26040  
gggttcgta caacaagtcc ggcccgatcg tgccgttcaa aacctgtcaa agtcattgcc 26100  
cacatactct tgggatcata ctgctcaata ctgggcagaa tctcgctcca cccgccagca 26160  
tcttcgtgga ggtgcgcccc atcttctgct tggaaagctt tcttcttaca gcacagcatc 26220  
gaccttcag tggacaaaact tcacaggcc ccgggatctg gaatggctcg acggtcatgc 26280  
gtacaaggc cagactgtgt tccccgtgc tgggtacata attatggcca tggaagctgc 26340  
catgaaggtg gctggtgagc gtgccgcca agttcagctc ctggaaatct tggacatgag 26400  
catcaacaaa gccatcgtgt ttgaagatga aaacacctcc gtggagctga acttgacagc 26460  
cgaagtcacc agtgacaatg atgcggatgg ccaagtcacg gtcaaatttg ttattgattc 26520



ctgtctggca aaggagagtg agctttcgac atccgccaaa ggccaaatcg tcataaccct 26580  
tggcgaggca tcaccgtcat cgcagctttt gccgccacct gaggaagagt acccccagat 26640  
gaacaatgtc aacatcgatt tcttctatcg ggaacttgac ctccttgggt atgactacag 26700  
caaagacttc cgtcgtttgc agaccatgag aaggggccgac tccaaagcta gcggcacctt 26760  
ggctttcctt ccacttaagg atgaattgcg caatgagccc ctcttgctcc acccagegcc 26820  
cctggacatc gcgttcaga ctgtcattgg agcgtattcc tctccaggag atcgtcgcct 26880  
acgctcattg tacgtgcta ctcacgttga cagagtgact ctgattccat cgtctgtat 26940  
atcggcgggt aattctgggtg aaaccgagct tgcgtttgac acaatcaaca cacacgacaa 27000  
gggtgatttc ctgagcggcg acatcacggt gtacgattcg accaagacaa cgcttttcca 27060  
agttgataac attgtcttta agcctttctc tccccgact gcttcgaccg accaccgaat 27120  
cttcgcaaag tgggtctggg gaccctcac gcccgaaaaa ctgctggagg accctgcgac 27180  
gttgatcata gctcgggaca aggaggacat tctgaccatc gagcgaatcg tttacttcta 27240  
catcaaatec ttctagccc agataacccc cgacgaccgt caaaatgccg acctccattc 27300  
ccagaagtac attgaatggg gtgaccaggt tcaggccgat gctcgggctg gccaccatca 27360  
gtggtaccag gagtcttggg aggaggacac ttctgttcac attgagcaaa tgtgtgaaag 27420  
gtacacccaa agctgttccg tgttttttca ttcttttata ttaacctttt acttgaagca 27480  
actcgtccca cccacatgtg cgcctgatcc aaagggtagg caaagaatta atttcaattg 27540  
ttcgcgggaa cggggatcct ttggatatca tgaaccgcga tgggttggtc accgagtact 27600  
ataccaacaa gctcgccttt ggctcagcaa tacacgtcgt tcaggatctg gttagccaaa 27660  
ttgctcatcg ctaccaatec attgatatcc ttgagatcgg taagtcgaat ctgaaatgta 27720  
agtaactagg cagtttgcta atctgtcgtt cgcttttttag gcttgggtac aggcacgcgc 27780  
acgaagcgcg ttcttgcatc acctcaactt ggtttcaaca gttacacttg cactgacatc 27840  
tcggcggatg ttattggcaa ggcccgtgaa caactttccg aattcgacgg tctcatgcag 27900  
tttgaggcac tagacatcaa cagaagccca gcagagcaag gattcaagcc tcaactctac 27960  
gatctgatta ttgcatcga tgtcctccat gccagctcca acttcgaggā aaaattggct 28020  
cacataaggt cttgtctaa gccgggtggg cacttggtta ctttcggggg caccatcgc 28080  
gagcctgctc gcctcgcctt catctctggg cttttcgtg atcgatggac tggagaagac 28140  
gaaactcgtg ctttgagtgc ctccgggtcc gttgaccaat gggagcatac cctcaagaga 28200  
gttgggttct ctggcgtcga tagtcggaca cttgatcgag aggatgattt gatcccgctc 28260

gtcttcagta cacatgctgt ggatgccacc gttgagcgtt tgtatgatec actttctgct 28320  
ccattgaagg actcatatccc gccattagt gttatcggtg gogaatcgac aaaaaccgaa 28380  
cgcattttga acgacatgaa agctgcccta ccgcatagac acatccactc cgtcaagcgg 28440  
ctggaaagt gttctcgacga cccggccttg cagcctaagt cgacttttgt cactctctcg 28500  
gaacttgatg atgaagtgtt ttgcaacctt gaagaggaca agtttgaggc agtcaagtct 28560  
cttctcttct acgccggacg catgatgtgg ctgacagaga atgcctggat tgatcatccc 28620  
caccaggcca gcaccatcgg aatgttgagg acaatcaagc tcgagaaccc tgacttggga 28680  
acgcacgtct tcgatgtcga tactgtggag aacctagaca ccaaattctt cgttgagcaa 28740  
cttttgcgct tcgaggagag cgatgatcag cttttggaat caataacatg gactcatgag 28800  
cccgaagtgt actggtgcaa gggtcgtgcc tgggtccctc gtttgaagca ggatattgct 28860  
aggaacgacc gtatgaactc gtctcgtcgt ccaattttcg gtaactttaa ttcttccaag 28920  
acggccattg cactgaaaga ggcgagggga gcactctcat cgatgtacta tcttgagtca 28980  
accgagacgt gtgattcggt agaagacgct cgatcatgct gaaaagcaac tgctcgtgtt 29040  
cgctacgctc tccccaggc aattcgcgtg ggccatctcg gatactcca tgctcgtcag 29100  
ggcagtattc tggagaatac atgtgagggt cctgtagtcg cctgggtga gaagaatgga 29160  
tctatactgc atgtaccgag aaactacatg catagtctgc ccgataacat ggccgaaggc 29220  
gaggatagtt cttctttgtt gtccacagct gcagccctcc ttgccgaaac aattctctct 29280  
agcgtcagtt cttttggctc tgatgcacaa attctgatta tggagcccc aattctctgc 29340  
gtcaaagcaa ttctggagtc ggccaaaacc tacggtgttc aggttcattt ggcaacaact 29400  
ctgtccgacg tcaaaactat tccggtcctt tggatccgat tacatgcaa ggaaaccgac 29460  
gtcgggtga aacacagcct gccgacaaac atgatggcat tctttgactt gtctaccgac 29520  
cggactgctg ccgggataac caaccgtttg gccaaagttg taccaccag ttgcttcatg 29580  
tacagtgggt actatcttat ccgaagtaca gttccacat acaaagttag tcatgttgag 29640  
gatattccaa tctcagagca ctctgtggca atggcaaaaa ataccgtctc tgcgtcgact 29700  
gtcgacgaca ctgagaaagt tattacagcc acacaaattc tcttgctgg tcagctctct 29760  
gtcaaccaca atgaccaacg cttcaatctg gccaccgtca tcgactggaa ggaaaatgag 29820  
gtgtccgcta ggatttgccc catcgactct ggtaacttat tttccaacaa gaagacgtat 29880  
ttgcttggtt gtcttaccgg ggaccttggc cgtctctct gtcgtggat gatcttgcat 29940  
ggcgcccgcc atgttgtgt cactagccgg aacctcgac ttgatccaa atggatcgcc 30000

aacatggagg caattggtgg tgacatcacc gttctgtcaa tgtaagttga ttgatatcac 30060  
atcacacctt gtaccacat cctcgtttac ttatccaatt actttcttta gggatgttgc 30120  
caatgaggat tcagtcgatg ctggccttgg caagcttgtc gatatgaagt tgccacctgt 30180  
tgccggcatc gcgttcgggc ctttggtgct gcaggatgtc atgctgaaga acatggacca 30240  
ccagatgatg gacatggtgt tgaagcccaa ggtacaagga gcacgcattc ttcatgaacg 30300  
gttctccgaa cagacgggca gcaaggcgct cgacttcttc atcatgtttt cgtccattgt 30360  
tgcagttatt ggcaatcctg gccagtcctaa ctatggcgct gcgaatgcct acctacaggc 30420  
tctggcccag caacggtgcg ccagaggatt ggcggtatth tctaccctg aattatcatg 30480  
catcgacgtc aagt tactaa cgcacaacca cagggatcaa ccatcgatat tgggtccgtt 30540  
tacggtgtag ggthtgtcac gagggccgag atggaggagg actttgatgc tatccgttth 30600  
atgthtgact cagttgaaga gcatgagctg cacacgctth tgcggaagc ggtcgtgtct 30660  
gaccagcgtg cccggcagca accacagcgc aagacggtca ttgacatggc ggaccttgag 30720  
cttaccacgg gtatccaga tcttgacct gcgcttcaag atcgaattat ttacttcaac 30780  
gacctcgtt tcggaaactt caaaattccc ggtcaacgcg gagacggtgg cgacaatgga 30840  
tcagggtcta aaggctccat tgccgaccag ctcaacaag caacaactth agaccaagth 30900  
cggcaaatcg tgattggtaa gttatctctc atcgthtthc tgatatcgag ttcaactaa 30960  
caaagttgca gatggtctat ctgagaaact ccgtgttacc ctccaagtht cggacgggga 31020  
gagcgtggac ccaaccattc ctctcattga tcaagggtgc gactccttgg gtgcagtgc 31080  
tgtcggtca tggthtctaa agcaactcta ccttgacctc cactcttga gggacttgg 31140  
cgggtgctth gtcgtgatc ttgcccagca cgcggccacc cgactcccag ctacatccat 31200  
tccgtgctg ttgcaaatg gtgattccac gggaacctcg gacagcgggg cttctccgac 31260  
accaacagac agcatgatg aagcaagctc tgctaccagc acagatgcgt cgtcagccga 31320  
agaggatgaa gagcaagagg acgataatga gcaggaggc cgtaagattc ttcgtcgcga 31380  
gaggtgtcc cttggccagg agtatctctg gaggcagcaa caaatggtaa aagatcatac 31440  
catcttcaac aacactattg gcatgttcat gaagggtacc attgacctcg accggttgag 31500  
gcgggctctg aaagctcat tgcgcgtca cgagatcttc cgtacgtgct ttgttactgg 31560  
cgatgactat agcagcgatt taaatggtcc cgtccaagtg gthtcaaga acccgagaa 31620  
cagagtgcac thtgttcagg tgaacaacgc tgcgaggca gaggaagagt accggaaact 31680  
cgagaagaca aactatagca tctccacagg tgacactctc agactcgttg atthtactg 31740

gggcacagat gaccacctgt tggtaatcgg ctaccacaga ttagttgggtg atgggtcaac 31800  
aacagaaaaac ctgttcaatg agatcgggca gatttacagc ggggtgaaaa tgcagcgacc 31860  
atcgacccaa ttctctgac tagccgtcca acagcgggaa aacctggaaa atgggcgaat 31920  
gggggacgat atcgcgttct ggaagtccat gcatagcaaa gtctcgtcat ctgcgccaac 31980  
cgtgcttccc atcatgaate tgatcaatga cctgctgcc aattcagagc agcagcaaat 32040  
acagccattc acgtggcagc agtatgaagc aattgctcgt ttagatccca tggtcgcctt 32100  
ccgaatcaaa gagcggagcc gcaagcacia ggcaaccccc atgcagttct acctggccgc 32160  
ctaccaagtt ttgttggcgc gtcttacggc cagcaaagac ataaccatcg gcctcgccga 32220  
aaccaaccga tccaccatgg aagaaatttc ggcatgggc tttttcgcta acgtgcttcc 32280  
cctgcgcttt gatgagttcg tcggcagcaa gacattcggc gagcaccttg tagccaccaa 32340  
ggacagtgtg cgtgaggcca tgcaacagc gcgggtgccg tatggcgta tctcgactg 32400  
tctaggcctg aatctcccta cctcaggcga ggaacccaag actcagacac acgccccctt 32460  
gttccaggct gtctttgatt acaagcaggg tcaagcggag agtgggtcaa ttggcaatgc 32520  
caaatgacg agtgttctcg ctcccgta gcgcactcct tatgacatcg ttctcgagat 32580  
gtgggatgac cctaccaagg acccactcat tcatgtcaaa cttcagagct cgctgtatgg 32640  
ccctgagcac gctcaggcct ttgtagacca cttttcttca atcctcacta tgttctcgat 32700  
gaacccggt ctgaagtgg cctagatcgt tcagcgccgt gaattcagat gtgtggtttg 32760  
agtgtgttc atgataaaga tggattagaa attggcaata gagcagatgg caaatctatc 32820  
ctgaattcgg cgtcaattga cacacgcata ttcatctaca aatagcgaat tegtcttcta 32880  
tctttgtcaa aattacttct accttcgttg ctcttcttta ttgcagcaat cgtaacatca 32940  
agttagatag cgcggttcag agtaccgtaa cggtgataaa tatacctcg tagcgcgttt 33000  
cgaaagactc tgtgaggaag gtgaaacctc caaggcttgg aattgatttc aatccatcct 33060  
gtatataaat tcgacgccat tgcaaatagt tccatagtta ctggtttagt gccttgttgt 33120  
ggatgatcag tggttttaga tgtctgtcat gcctgttcag aacgagcctt ccatgatcta 33180  
tccaaaatat gttcacgaaa tatttatgag atggtcgca cactataac taaatcacc 33240  
ttggaagggtg agcattcaaa cgtgtaaga ttagaactat tcaaatgtt tcagtaaaaa 33300  
tgtggtatgg actaggcatg agagccagag cttgtctata taccctgttg tctcacctag 33360  
acaaatgaac ctgacatctt gaccttttga tatagctgtt ggaagcgtt gaccgtctcc 33420  
tggacatcac tcggtctgtt gggaaaatta tgctttccct gaaactcgag tacatctgca 33480

ttctgaggca ggtaatgtgt ttcaaccatc tgtctcgacc ctgggagagc aaaatcttga 33540  
cgaccgtgaa gatgcagtgt cggcacgttg attattagct tgcgtcgtc gtcttgcgcc 33600  
tcggctctca tgtaatctct ggcttcacgc ctatagaaac agcaaataca aacagcaatg 33660  
ctcattttcg gaaacatgg cagttttccc atttgcgtgt gatggagcag caaagtggcg 33720  
accaatgcgc cctcagagaa ggccactatg ccgacaatgg gtgcctgttg gttagttata 33780  
gaccaatctt ggacgggtctt ttgcacaggc ccgatcacag ccgtactct atcgccacc 33840  
gtgggggttg tcgtgtttgt aacggcgta tgatgctttt ggaaccagggt gtagtatgga 33900  
cccatgcctt ggaagacagg aagcacgccg ggtccggggc tggagctaaa cggcgcggtc 33960  
gcataacga attcaaactc gtttttcaac gccacgcgca gtttagagat ctggacgcgg 34020  
aatatggctg ctgagcacc ggccacgttg atgcataaga gagcttttct cggtttgcct 34080  
ggcgagaaat ctgtaatcct cgtggactc attttctctt gtggtgtgag ctgtgacttc 34140  
gtctgttctg gggaatttgt tagtcattac tgacaaggaa ataacaacga cgtagtattg 34200  
atc 34203

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer  
which has a DNA sequence deduced from the amino  
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (9)

<223> i

<400> 3

gayacngcnt gyasttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A mixed primer  
which has a DNA sequence deduced from the amino  
acid sequence of PKS of *Aspergillus flavus*.

<220>

<221> modified base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (8)

<223> i

<220>

<221> modified base

<222> (15)

<223> i

<400> 4

tencnknrc wgtgncc

17

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 5

gcatgttcaa tttgtctc

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 6

ctggatcaga cttttctgc

19

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 7

gtcgcagtag catgggcc

18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 8

gtcagagtga tgctcttctc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 9

gttgagagga ttgtgagggc

20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 10



ttgcttgtgt tggattgtc

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 11

catggtactc tcgcccgttc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 12

ctccccagta cgtaagctc

19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 13

ccataatgag tgtgactgtt c

21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 14

gaacatctgc atccccgtc

19

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 15

ggaaggcaaa gaaagtgtac

20

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 16

agattcattg ctgttgcat c

21

<210> 17

<211> 722

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 17

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg gggggggggg gcttggtcgc tcagagattc 60

aactctgcga ttctgtttaa tcccaatcct atcgcccaaa aacaggatca gcagttatgg 120

atcaagccaa ctatccaaac gagccaattg tggtagtggg aagcggttgt cggtttccag 180  
gtgggtgtcaa cacaccatca aaactttggg agctgtctaa agagccccgg gatgtacaga 240  
ccaagatccc taaggagaga tttgacgtcg atacatttta cagccccgat ggcactcacc 300  
ccggggcgac gaacgcaccc tttgcatact tgctgcagga ggatctacgc ggttttgatg 360  
cctctttctt caacatccaa gctggagagg ccgaaacgat tgaccacacag caaaggctgc 420  
tgctggagac ggtctatgaa gctgtatcca acgcaggcct acggatccaa ggccttcaag 480  
gacctctac tgctgtgtac gtcggtatga tgacgcatga ctatgagact atcgtgacgc 540  
gtgaattgga tagtattcct acatactctg ccacgggggt agctgtcagt gtggcctcca 600  
accgtgtatc atactttctt gactggcatg ggccgagtat gacgatcgac acagcctgta 660  
gttcacctt agctgccgtg catctggccg tccaacagct tagaacgggc gagagtacca 720  
tg 722

<210> 18

<211> 760

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 18

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gggggggggg gactatcaac ggttttatca 60  
ccagggcgac tgatatatca gtcaatgaaa caacgttga atgaacaata cccccgccgt 120  
aaccgcaacc gcaaccgcaa ccgcaaccgc aaccgcaatg gcaggctcgg cttgctctaa 180  
cacatccacg ccatttgcca tagttggaat gggatgtcga tttgctggag atgcaacgag 240  
tccacagaag ctttgggaaa tggttgaaag aggaggcagt gcctgggtcta aggtccctc 300  
ctcgcgattc aatgtgagag gagtatacca cccgaatggc gaaagggtcg ggtccacca 360  
cgtaaagggt ggacacttca tcgacgagga tcctgcttta tttgacgccg cgttcttcaa 420  
catgaccaca gaggtcgcca gctgcatgga tccgcagtat cggcttatgc ttgagggtgt 480  
ctacgaatcg ctggagagtg ccggtatcac catcgatggt atggcaggct ctaatacgtc 540  
gggtgttggg ggtgtcatgt accacgacta tcaggattcg ctcaatcgtg accccgagac 600  
agttccgcgt tatttcataa ctggcaactc aggaacaatg ctttcgaacc ggatatcaca 660

cttctacgac ttacgtggtc ccagcgtgac ggttgacacg gcctgttcga cgacattgac 720  
cgcaactgcac ttggcgtgcc agagcttacg tactggggag 760

<210> 19

<211> 773

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 19

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg ggttttttt ttttcaagg tgaactggaag 60  
agtgtctctg gccacaaat ccagaagca ttagtgtgtg tttcgatta taaaccgtcg 120  
cagcgtcttc attcttcgtt cttttctctt ttccactggg gtgcataggt cctatctgtc 180  
tcacgcaatg ctgggccagg ttctttctgac cgtcgaaatg taccaatggg tatcgacccc 240  
tcaagccctt gtggcggtcg cagtgtctct tagtctcacc gcctaccgtt tgcgggggag 300  
ccagtccgaa ctgcaagtct ataatcccaa aaaatgggtg gagttgacga ccattgagggc 360  
taggcaggac ttcgatacgt atgggtccgag ctggatcgaa gcttggttct cgaaaaacga 420  
caagcccttg cgttcattg ttgattccgg ctattgcacc atcctcccat cgtccatggc 480  
cgacgagttt cggaatatca aagatatgtg catgtacaag tttttggcgg atgactttca 540  
ctctcatctc cctggattcg acgggttcaa ggaaatctgc caggatgcac atcttgtcaa 600  
caaagttgtt ttgaaccagt tacaanacca agcccccaag tacacaaagc cattggctac 660  
cttgcccgac gctactattg ccaagttgtt cggtaaaagc gaggagtggc aaaccgcacc 720  
tgtctattcc aatggattgg acctgtcac acgaacagtc acactcatta tgg 773

<210> 20

<211> 527

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 20

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gtacctagga actgttcagt tgtccctccc 60  
aacccttgg gccgaacaac cttcctccaa tctacgacgg cagattatac ctaggcgcct 120  
aacggattag gttgctcatt cgattttgga gagactacct agctataggt accactccaa 180  
gctgtagcac agacctttca gcatggctgc ttcgttgcta cctctctgct ttgcggtag 240  
ggaatcaatg aatcagcagc accctctacg ctcgggaaat cgggcattga cctccacact 300  
ccaatttcta tccaaaacgg cgtgtctaca cccgatccat accgtttgca ccatagctat 360  
tctagctagt accacatacg ttggactact caaagacagc ttcttccatg gccccgcaaa 420  
cgttgataaa gcagaatggg gctctttggt cgaaggaagt cgaagcttga tcaccggccc 480  
acagaatggc tggaagtggc agagcttcca cggggatgca gatgttc 527

<210> 21

<211> 522

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 21

ggccacgcgt cgactagtag gggggggggg gggggggggg ggatccatca atctgacttc 60  
aggctagcgg accttaacga aacaacgaga gcgagatcat tcatacacca aaacacaggt 120  
actatagaag cgccgcgcag tagagattca caccgccct tgaagcaaaa gtcggaagga 180  
attgcgcgat gtcagaacct ctacccccta aagaaggga accaaggcca cagaaggaag 240  
aaagtcaaaa tgacacgctc gaagcgactg agtccaagtc ccagcacatc acaggcctca 300  
agctcgggct ggtggttgct tcagttactt tcgtagcatt tttgatgctc cttgatatgt 360  
ccattatcgt cacggcaatc ccacatatca caagcgagtt ccactctctg aacgatgtag 420  
ggtggtacgg cagtgettat cttctggcta actgtgctct ccagccctg gccggtaaatt 480  
tgtatacact cttgggcttg aagtacactt tctttgctt cc 522

<210> 22

<211> 541

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 22

ggccacgcgt cgactagtac gggggggggg ggctcacctc acattatttg atcttaatcc 60  
aataattatg tccttgccgc atgcaacgat tccgacgaac ctacgccgtc ggcggtttcg 120  
acgctcatgt gaccgggtgc atgcacaaaa gctcaaatgt accggtagca atgccaattt 180  
agtcctgtct cagtgtcaac gttgtcagca agccggatta aggtgtgtgt acagcgaaag 240  
gtacccaag cgcaatttac ataaagaagc cgcagctgga actacaagag ccacagaaac 300  
ctcacaaccg atgaccgga catcttctac ggtcttctca tcattggcag agactcctcc 360  
accttactgc tcaccaccta cgcattattgg caccctcgga ctcaaggaaa cattatcaga 420  
accatcagcg gcaaccctgc aattctatga tacatcaate aactttgatg atcccagatc 480  
gtttcccggc ggctggcctc agccaaatac atttcgcgac gatgccaaca gcaatgaatc 540  
t 541

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 23

atcataccat cttcaacaac

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 24

gctagaatag gttacaagcc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 25

acattgccag gcacccagac

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 26

caacgcccaa gctgccaatc

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 27

gtcttttctt actatctacc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

&lt;400&gt; 28

ctttcccgagc tgctactatc

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 1524

&lt;212&gt; DNA

<213> *Penicillium citrinum*

&lt;400&gt; 29

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttcaa cgaaggtaga 60  
agtaattttg acaaagatac aagacgaatt cgctatttgt agatgaatat gcgtgtgtca 120  
attgaagccg aattcaggat agatttgcca tctgctctat tgccaatttc taatccatct 180  
ttatcatgaa caacactcaa accacacatc tgaattcacg gcgctgaacg atctaggcca 240  
acttcagagc cgggttcacg gagaacatag tgaggattga agaaaagtgg tctacaaagg 300  
cctgagcgtg ctgaggcca tacagcgagc tctgaagttt gacatgaatg agtgggtcct 360  
tggtagggtc atccacatc tcgagaacga tgcataagg agtgcgctca cgggaagcga 420  
gaacactcgt cattttggca ttgccaattg agccactctc cgcttgaccc tgcttgtaat 480  
caaagacagc ctggaacaag ggggcgtgtg tctgagttt gggttcctcg cctgaggtag 540  
ggagattcag gcctagacag tcgaggatga cgccatacgg caccgcgcg tgttgcattg 600  
cctcagcac actgtccttg gtggtacaa ggtgctcgcc gaatgtcttg ctgccgacga 660  
actcatcaaa gcgcagggga agcacgttag cgaaaaagcc catcgccgaa atttcttcca 720  
tggtggatcg gttggtttcg gcgaggccga tggttatgtc tttgctgccg gtaagacgcg 780  
ccaacaaaac gtggtaggcg gccaggtaga actgcatggg ggttgccttg tgcttgccgc 840  
tccgtctttt gattcggaag gcgaccatgg gatctaaacg agcaattgct tcatactgct 900  
gccacgtgaa tggtgtatt tgctgctgct ctgaattggc agcagggtca ttgatcagat 960  
tcattgatggg aagcacggtt ggccgagatg acgagacttt gctatgcatg gacttcaga 1020  
acgcgatatc gtccccatt cgccattttt ccaggttttc ccgctgttgg acggctagat 1080  
cagagaattg ggtcgatggt cgctgcattt tcaccccgct gtaaattctg ccgatctcat 1140



tgaacagggtt ttctgttggt gagccatcac caactaatct gtggtagccg attaccaaca 1200  
gggtggtcac tgtgccccag tagaaatcaa cgagtctgag agtgtcacct gtggagatgc 1260  
tatagtttgt cttctcgagt ttccgggtact cttcctctgc ctccgcagcg ttgttcacct 1320  
gaacaaagtg cactctgttc tccgggttct tgagaaccac ttggacggga ccatttaaat 1380  
cgctgctata gtcacgcca gtaacaaagc acgtacggaa gatctcgtga cggcgcaatg 1440  
aggctttcag agcccgctc aaccggctga ggtcaatggt acccttcatg aacatgcaa 1500  
tagtggttgt gaagatggta tgat 1524

<210> 30

<211> 784

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 30

aactggaaga attcgggcc gcaggaattt ttttttttt ttttttttc tttgttgett 60  
ctcagggccca ctgtaatggt atttcaggta tctctattta ctgctatcca gaagtcaggc 120  
attaaatagt caggctcagc ccaggctcga ttcagattgg attcaggctt cagaccatgg 180  
ccgctatgct ctttcgtact atacctcgt cgagctatac ccgcttgcc agacaaaagg 240  
cttcaactgaa cccttcaact taactgcatt tcgccacaac taactcgacg aggccggcga 300  
tggtgttacc attcatgagc tcaaagatcg acacatcaac atggatttca gatgtgatcc 360  
agtttcgaag ttcaatggcg acgagtgagt ctacgccgac acctgccagg tttttggacg 420  
aggacatgtc gtcttctgcc agaccaaaca ttgcacacag cttttccgtc attgctttga 480  
ggacgataga aatggcctcg tcgtgagagg tgacctgct tagttgggcc cgcacgccat 540  
ctggctccttt tttatgcgaa gagacaaagg attggtctgc atgaaggact tggcggtatt 600  
taagtccac aaaccgctgt tctgtatcc agtttgcctc ggtccagtga gcaccgggg 660  
atgtgttgat tctgttaacc acagctgcgg gaggtgatgg aaattgaggg gaagaacaca 720  
ggattgcctt ctccaacaca tccatgacgt ccttttcatg cataggttg taacctattc 780  
tagc 784

<210> 31

<211> 764

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 31

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttttttc gaataaaatg 60
cgttttattt tactaaccta ctgactaat acagcaccta gtttctctgg gacggaaacc 120
attggaataa gcctggggac ggatgcatat ttgttttagt ttgcgtgtta tatcttagca 180
ccggtcatga gggagcggga tgtcctcggt gcgccggcgt accatgagct ttgtggttgg 240
atgcatacga acgctaaaag cgtgacggta gtatttgtca tcgtctctcg gtacaggctt 300
cacatcatac tgaatcagta tatgagcgag gagaatcttg atttccttcg aggcgaagaa 360
ccgcccggga caagcgcgtg ggttccagcc gaagccgatg tgatcacctg tggattcttc 420
caattgagcg gtgaaggcct tgtctggatc ctgcgcgatg cgcataaatc ggtagggatc 480
ataattttcg gggttttccc acacatcagg gttgttcatg cggctctgcag ccacagcggc 540
caactcgccc ttgggaatga agaggccatt ggatagagtg atgtctctga gagcgggtact 600
gcgcatagtg gcgcactcga ccggttgat tcgctgcgtc tctttcatgc agctgtcgag 660
gagcttcage ttgaacagag aggcaggcgt ccagccccct tctccgatta cagtgcggat 720
ctcttggcgg agaggctgaa taaggtctgg gtgcctggca atgt 764
```

<210> 32

<211> 765

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 32

```
aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt tttttttttt tttttctgg aaaaggacca 60
tctctttata tattcttttt cctactact tgcactgtaa atttcaacaa catataaaca 120
tgagataccc tttctggcgg ttcactctac cacctgcctg tctcattgca ttgtgctttt 180
```

gaaaattatg acaataacaa ccaatgagaa aaaatatgat cctcctgcaa tgaatccact 240  
ggagggggta cggagcttgg aatgtccta agattccgac ctaatcagcg tcgagccga 300  
tcagtagctg cagcactcgg cctcagtga ttgttaggaa cagggactgt cctggttccg 360  
cctgacgggg agacacttcg agaaggggct gaagatgccg gggcagaacg gttgtgcgc 420  
atgtgcgcct tgaccaggtg accggcggct agggcagcac atagcgagag ctccccagcc 480  
aaaacagcgc ttccgatgat gcgcgcaagt tgacgtgcat tctcaccggg agtggtcggg 540  
tgtgatccgc ggacaccaag catgtcaagc attgcgcctt ggggctccag aatcgtacca 600  
ccgcccacg ttccaacctc aatagacggc atggagacag agatttgaag cgatccgcga 660  
agattgttca tgagagtgat gcagttagcg ctctccacaa cttgcgccgg atcctgacct 720  
gtggcaatga aaatggctgc cgcaagattg gcagcttggg cgttg 765

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 802

&lt;212&gt; DNA

<213> *Penicillium citrinum*

&lt;400&gt; 33

aactggaaga attcgcggcc gcaggaattt ttttttttt tttttataga atctttgaaa 60  
tcgacattaa ttaagtatgt ggagattctt tgtggaggca cggtaatgtg tctatctagc 120  
aacgcggtca agcatcagtc tcaggcacag cccgggtgtc gtttttggtt gcaatcttcc 180  
gccatcccat tccaaaggca aacacaaacg tgcacgccgt agtccccact gctaagtaaa 240  
aagtatgata aacggcgaga ctgtaagctt ttacaacccc tggaagggtta ttcttctgta 300  
ccacatctct gaagccagtc gcccctgtg ccgtcacggc ctgcgtgtcg acagtgggcg 360  
catacttgct caggccagtt ctcaaaccgg acccaaagac aaggtttagca aagtccagga 420  
agagcgatcc tccaaacgtc tgtccaaaca cggcgagaga aattccgagg gcacctgttt 480  
cgggcgaaag cgtgcttttg atggcgatga taggcgtttg catgccacaa ccacgaccga 540  
agcccgcgat aaattggtac atgacccatt tcacagttga tgtatggggc tggaagggtg 600  
ataccagacc tgcgcctatg gcgacgagaa cagcgtgcc tagggcccaa ggcaaatagt 660  
atcctgtctt tccaattgcg aagccagaaa ccatagccat aatgacttgt ccaagaattc 720

caggcaacat gtacacacca ctacagtgtg gagaaacatc cttcacagcc tggaagtaga 780  
tcggtagata gtaggaaaag ac 802

<210> 34

<211> 562

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<400> 34

aactggaaga attcgcggcc gcaggaatct tttttttttt ttttttttac taagcaatat 60  
tgtgtttctt cgctaattgc aatatttctt tatagcaacg tcgcaacaca tttatcgtct 120  
tccctgaggc ctttgttgac ttgggtctct cgtctccggc ttctcactc caaagcacag 180  
ataggagacg agaggccggc gttatgggtt tattttcagc gccaaaggatt tgccacgatg 240  
tgcttgcat atctgatagg actagacgaa tagatgccgc agccccgtgc tcctgtgcta 300  
tcccaaagc agtctcaatc cactcaata gtgaaggct tacacgcaat gtcgtgcatg 360  
cagaagataa ggcgtgcatg aatgggtcga gatgtgaaat gagctcgccg atatgaagat 420  
tagagtgaag cgaggaagt gcttcggctc ttccattgtc atttctagtg gttgagccag 480  
accagtacca atccattcgt gtgctttgct ttgtccaca aggttgggct ttcacacct 540  
cggatagtag cagctgggaa ag 562

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05420

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,  
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,  
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq, PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kennedy J. et al., "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis", Science (May 1999) Vol.284, pp.1368-1372	1-60
Y	Hendrickson L. et al., "Lovastatin biosynthesis in Aspergillus terreus : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene", Chem. Biol. (June 1999) Vol. 6, No. 7, pp.429-439	1-60
Y	WO, 95-12661, A (Merck & CO INC), 11 May, 1991 (11.05.91), & AU, 9480955, A & EP, 726940, A1 & JP, 9-504436, A & US, 5744350, A & US, 5849541, A	1-60
Y	Serizawa N., "Development of two-step Fermentation-based Production of Pravastatin, a HMG-CoA Reductase", J. Synthe. Organ. chem. (1997) Vol. 55, No.4, pp.334-338	1-60
Y	FUJII, I, "Polyketide Kousei Busshitsu Seigousei Idenshi no Cloning", Research report of Mochida Kinen	1-60

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 November, 2000 (20.11.00)

Date of mailing of the international search report  
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,  
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/31, C12N15/52, C12N15/63, C12N1/19,  
C12N1/21, C12P7/40, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)  
GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq, PIR

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kennedy, J. et al. "Modulation of Polyketide Synthase Activity by Accessory Proteins During Lovastatin Biosynthesis" Science (1999, May) 第284巻 p. 1368-1372	1-60
Y	Hendrickson, L. et al. "Lovastatin biosynthesis in <i>Aspergillus terreus</i> : characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthesis gene" Chem. Biol. (1999, Jun.) 第6巻 第7号 p. 429-439	1-60

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488